

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



Facultad de Medicina

Tesis Doctoral

*“Estado protrombótico de la enfermedad de Behçet:
caracterización de la hemostasia mediante técnicas
globales y estudio del papel pro-inflamatorio de las
plaquetas”*

Ihosvany Fernández Bello

Madrid - 2014

Directores:

Dra. Nora Butta Coll

Instituto Para La Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (FIBHULP)

Hospital Universitario La Paz

Dr. Víctor Jiménez Yuste

Servicio de Hematología y Hemoterapia

Hospital Universitario La Paz

Profesor Asociado de Ciencias de la Salud. Departamento de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Agradecimientos

A mis directores de tesis la Dra. Nora Butta y el Dr. Víctor Jiménez Yuste por hacer realidad un sueño.

Al Dr. Francisco Javier López Longo por su inestimable contribución en la inclusión de pacientes en el estudio y en la evaluación e interpretación de los datos.

A las enfermeras del Servicio de Reumatología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y del Servicio de Donantes del Hospital Universitario La Paz por su apoyo y comprensión, sin ellas nada de esto habría sido posible.

A Elena, Fernando y Carlos por sus consejos, apoyo y ánimo durante todo este tiempo.

A mi familia por su paciencia, cariño y confianza.

A todos muchas gracias.

Todo final es el comienzo de un principio.....

Índice de Materias

Abreviaturas	5
1. Introducción	7
1.1 Enfermedad de Behçet	9
1.1.1 Diagnóstico	9
1.1.2 Epidemiología	11
1.1.3 Etiopatogenia	11
- Agentes infecciosos	12
- Factores genéticos	13
- Alteraciones de la función de células del sistema inmune	14
- Trombofilia	15
1.1.4 Manifestaciones clínicas	17
1.1.5 Pronóstico	19
1.1.6 Tratamientos	19
1.1.7 Modelos animales de la enfermedad	20
1.2 Inflamación	21
1.2.1 CD40, CD40 ligando, CD40 ligando soluble	21
1.2.2 Metaloproteasas	24
1.2.3 Selectinas	23
1.2.4 Fibrinógeno	29
1.3 Hemostasia	30
1.3.1 Hemostasia primaria	30
1.3.2 Hemostasia secundaria	33
1.3.3 Fibrinólisis	39
1.3.4 Regulación de la hemostasia	40
1.3.5 Relación entre la coagulación y la inflamación	40
1.3.6 Técnicas para la evaluación global de la hemostasia	43
- Tromboelastometría Rotacional (ROTEM®)	43
- Trombinografía Automática Calibrada (CAT)	47
2. Hipótesis	51
3. Objetivo	55
4. Materiales y Métodos	59
4.1 Sujetos del estudio	61

4.2 Criterios para la inclusión y exclusión de sujetos en el estudio.....	61
4.3 Extracción y preparación de las muestras	62
4.4 Técnicas para la evaluación global de la hemostasia.....	63
4.4.1 Tromboelastometría Rotacional (ROTEM®)	63
4.4.2 Trombinografía Automática Calibrada (CAT).....	63
4.5 Determinación de marcadores plasmáticos relacionados con la inflamación, la hemostasia y el daño o activación endotelial.....	64
4.6 Determinación del estado de activación plaquetaria	65
4.7 Estudio de la agregación plaquetaria.....	65
4.8 Determinación de agregados de plaquetas y leucocitos	65
4.9 Condiciones de cultivo de las células MEG-01.....	66
4.10 Niveles endógenos de CD40 y CD40L en plaquetas y células MEG-01	66
4.11 Exposición de CD40L en la superficie de plaquetas y células MEG-01	68
4.12 Determinación de los niveles de sCD40L en plasma y sobrenadante de plaquetas y células MEG-01	69
4.13 Determinación de la actividad gelatinolítica de la MMP-2 y la MMP-9 en el lisado y sobrenadante de plaquetas y células MEG-01	69
4.14 Determinación de la concentración de MMP-9 en plasma	70
4.15 Análisis estadístico	70
5. Resultados	71
5.1 Sujetos incluidos	73
5.2 Tromboelastometría Rotacional (ROTEM®).....	74
5.3 Trombinografía Automática Calibrada (CAT).....	75
5.4 Recuento de células y nivel plasmático de marcadores relacionados con la inflamación, la hemostasia y el daño o activación endotelial	76
5.5 Relación entre la actividad de la enfermedad, la coagulación y el daño y/o activación endotelial	77
5.6 Estudio de la activación plaquetaria	80
5.7 Niveles plasmáticos de sCD40L	83
5.8 Niveles antigénicos de MMP-9 en plasma y en plaquetas	88
5.9 Estudio del sistema CD40/CD40L en células MEG-01.....	91
5.10 Estudio del efecto del sCD40L sobre la actividad de la MMP-9 de las células MEG-01	94

6. Discusión	97
6.1 Técnicas para el estudio global de la hemostasia: ROTEM® y CAT	99
6.1.1 Recuento de plaquetas y de eritrocitos.....	99
6.1.2 Estado de activación plaquetaria.....	99
6.1.3 Fibrinógeno.....	100
6.1.4 PAI-1 y tPA	101
6.1.5 TAT y dímero-d	102
6.2 Activación y/o daño endotelial.....	103
6.3 Participación de las plaquetas en el estado inflamatorio de la EB.....	104
6.3.1 Papel de la MMP-9 plaquetaria	104
6.3.2 Papel del sCD40L plaquetario	105
6.3.3 Sistema de retroalimentación positiva entre la MMP-9 y el sCD40L	107
7. Conclusiones.....	109
8. Referencias bibliográficas	113
9. Publicaciones.....	134

Abreviaturas

ADP: Adenosín difosfato
AE: Actividad de la enfermedad
AP: Altura del pico
APL: Agregados de plaquetas y leucocitos
AT-III: Antitrombina III
C40L: CD40 ligando
CAT: Trombinografía automática calibrada
CD62E: E-selectina
CD62L: L-selectina
CD62P: P-selectina
CFT: Tiempo de formación del coágulo
CP (MCF): Contribución plaquetaria a la fortaleza máxima del coágulo
CP: Contribución plaquetaria
CT: Tiempo de coagulación
DE: Desviación estándar
EB: Enfermedad de Behçet
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
ETP: Potencial endógeno de trombina
F: Factor
FCE: Factor de crecimiento epidérmico
FIXa: Factor IX activado
FIXa-FVIIIa: Complejo Tenasa
FT: Factor tisular
FVa: Factor V activado
FVIIa: Factor VII activado
FVIIIa: Factor VIII activado
FvW: Factor von Willebrand
FXa: Factor X activado
FXa-FVa: Complejo Protrombinasa
FXIa: Factor XI activado
FXIIa: Factor XII activado
GP: Glicoproteína
HLA: Antígeno leucocitario humano
HMWK: Quininógeno de alto peso molecular
ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular de tipo 1
ICR: Institute of Cancer Research
IL: Interleucina
INF- α : Interferón α
ISGBD: Grupo Internacional para el Estudio de la Enfermedad de Behçet
ITR-ICBD: Grupo Internacional para la Revisión de los Criterios Internacionales de la Enfermedad de Behçet
IV: Índice de velocidad
K: Caliceína
mAb: Anticuerpo monoclonal

MAP: Proteínas activadas por mitógenos
MCF: Fortaleza máxima del coágulo
MHC-I: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo I
MMP: Metaloproteasa
MMP-2: Metaloproteasa 2
MMP-9: Metaloproteasa 9
MMP-9-I-I: Inhibidor específico de la MMP-9
MMPs: Metaloproteasas
OMIN: Online Mendelian Inheritance in Man
p25: Percentil 25
p75: Percentil 75
PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PAI-2: Inhibidor del activador del plasminógeno-2
PAR: Receptores activados por proteasas
PChT: Proteínas de choque térmico
PK: Precalicroína
PMA: Forbol 12-Miristato 13-Acetato
PMN: Polimorfonucleares
PPP: Plasma pobre en plaquetas
PRP: Plasma rico en plaquetas
PSGL-1: Ligando glicoproteico-1 de la P-selectina
ROTEM®: Tromboelastometría Rotacional
sC40L: CD40 ligando soluble
sCD62E: E-selectina soluble
sCD62P: P-selectina soluble
SDS: Dodecilsulfato de sodio
TAFI: Inhibidor de la fibrinólisis activado por la trombina
TAP: Tiempo al pico
TAT: Complejo trombina-antitrombina III
TL: Tiempo de latencia
TNF: Factor de necrosis tumoral
TNF- α : Factor de necrosis tumoral α
tPA: Activador tisular del plasminógeno
TRAP: Péptido agonista del receptor de trombina
Tris: tris(hidroximetil)-aminometano
uPA: Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
VCAM-1: Molécula de adhesión vascular-1
VHS-1: Virus del herpes simple de tipo 1

1. Introducción

1.1 Enfermedad de Behçet

La enfermedad de Behçet (EB, OMIM #109650) es una enfermedad crónica, multisistémica, de naturaleza inflamatoria, caracterizada por la presencia de vasculitis inespecífica [1] y un estado protrombótico de causa desconocida [2]. A nivel clínico se identifica por la aparición recurrente de úlceras bucales y genitales y uveítis que conforman la triada característica de esta patología [3, 4]. La sintomatología puede extenderse a otros órganos y sistemas apareciendo lesiones a nivel articular, cutáneo, cardiovascular, pulmonar, gastrointestinal y del sistema nervioso central [5].

La existencia de esta patología ya fue reconocida por Hipócrates en el siglo XV d. C. Posteriormente fue descrita en 1931 por el oftalmólogo griego Benediktos Adamantiades pero no fue hasta 1937 que el dermatólogo turco Hulusi Behçet la describiera por primera vez como una entidad caracterizada por la triada de úlceras orales y genitales e inflamación ocular [4].

En la actualidad se manejan varias terminologías, todas ellas aceptadas, para referirse a la EB. Por un lado, dado que a nivel internacional existe consenso en reconocer al Dr. Hulusi Behçet como el descubridor de esta condición clínica, se la llama “Behçet”, pero un número pequeño de autores prefieren llamarla “Adamantiades” o “Adamantiades-Behçet”. Por otro lado, un gran porcentaje de autores la consideran “enfermedad” asumiendo que se trata de una sola entidad que origina síntomas comunes y variables en el conjunto de los pacientes afectados, mientras que otros prefieren utilizar del término “síndrome” apoyándose en el hecho de que el desconocimiento de la etiopatogenia impide tener la certeza de que el cuadro clínico es consecuencia de un único proceso patológico o alteración funcional.

1.1.1 Diagnóstico

Debido a que no existe un test diagnóstico para la EB, el diagnóstico de la enfermedad se basa en criterios clínicos. A lo largo de los años se han definido varios criterios diagnósticos pero entre los más importantes cabe destacar los definidos en el año 1990 por el *Grupo Internacional para el Estudio de la Enfermedad de Behçet* (ISGBD, de su nombre en inglés: *International Study Group for Behçet's Disease*) [6]. Estos criterios evaluaban la presencia de 5 manifestaciones clínicas: úlceras orales y genitales, lesiones a nivel de la piel, manifestaciones

oculares y la presencia del fenómeno de patergia, e incluían a las úlceras orales como manifestación obligatoria. Con el objetivo de mejorar la sensibilidad en el diagnóstico, en el año 2006 el *Grupo Internacional para la Revisión de los Criterios Internacionales de la Enfermedad de Behçet* (ITR-ICBD, de su nombre en inglés: *International Team for the Revision of the International Criteria for Behçet's Disease*) define unos nuevos criterios diagnósticos que son los utilizados en la actualidad [7]. A diferencia de los criterios del ISGBD, los criterios diagnósticos del ITR-ICBD no incluyen ninguna manifestación obligatoria y a cada manifestación clínica le asigna un valor en puntos siendo necesaria al menos una suma total de 3 puntos para confirmar el diagnóstico de la enfermedad. Además, debido a que está ampliamente aceptado que las manifestaciones clínicas a nivel vascular son características de la EB, los criterios del ITR-ICBD las incluyen dentro de los criterios diagnósticos. En la tabla 1 aparece una comparativa entre ambos criterios diagnósticos.

Tabla 1: Comparativa entre los criterios diagnósticos del *Grupo Internacional para el Estudio de la Enfermedad de Behçet* (ISGBD) definidos en el año 1990 y del *Grupo Internacional para la Revisión de los Criterios Internacionales de la Enfermedad de Behçet* (ITR-ICBD) del año 2006.

ISGBD (1990)	ITR-ICBD (2006)
Manifestación obligatoria: Úlceras orales	Manifestación obligatoria: (no se exige)
Presencia de 2 de las siguientes manifestaciones: Úlceras genitales Manifestaciones cutáneas Manifestaciones oculares Test de Patergia positivo	A cada manifestación se le asigna un valor mediante un sistema de puntos (se requieren al menos un total de 3 puntos): Úlceras orales: 2 puntos Úlceras genitales: 2 puntos Manifestaciones cutáneas: 1 punto Manifestaciones oculares: 1 punto Test de patergia positivo: 1 punto Manifestaciones vasculares: 1 punto

1.1.2 Epidemiología

La EB es una enfermedad rara, incluida en el portal de información de enfermedades raras y medicamentos huérfanos *Orphanet* con el código ORPHA117.

La mayoría de los estudios epidemiológicos realizados hasta la fecha se centran en la población adulta en la que esta enfermedad aparece con más frecuencia [8, 9].

La enfermedad se distribuye ampliamente a nivel mundial debido al fenómeno migratorio aunque presenta una mayor prevalencia en Turquía, Iraq, Irán, Corea y Japón, poblaciones que descienden históricamente de la región que abarcaba la antigua “Ruta de la Seda” [10]. La mayor prevalencia descrita hasta la fecha se encuentra en Turquía con 421 casos cada 100.000 habitantes [11].

En España se disponen de pocos datos epidemiológicos sobre la prevalencia de la enfermedad. Se han publicado datos sobre la prevalencia en Granada [12] y en el norte de España [13, 14] (tabla 2).

Tabla 2: Prevalencia estimada de la EB en algunas localidades españolas.

Autor-año de publicación de los datos	Localidad	Prevalencia estimada (casos/10 ⁵)
Eiroa P.-1991	La Coruña	5,6
González-Gay M.A.-2000	Lugo	0,66
Peñafiel R.-2007	Granada	5

1.1.3 Etiopatogenia

La causa de la EB es desconocida aunque los datos disponibles indican que podría tener un origen multifactorial en el que confluyen factores endógenos del sujeto y factores medioambientales.

La mayoría de los estudios se han centrado en la contribución de microorganismos, factores genéticos, trombofilia y alteraciones en las células del sistema inmune. En conjunto, los datos disponibles sugieren que la EB representa una respuesta inmune alterada frente a la presencia de un patógeno más que el efecto o la acción directa del agente infeccioso, lo que da soporte a la hipótesis de la existencia de factores intrínsecos que contribuyen al desarrollo de la enfermedad.

- Agentes infecciosos

Existen estudios que identifican al *Streptococcus sanguis* como posible agente causal de la EB. En la flora oral de los pacientes con EB se puede encontrar una proporción mayor de *Streptococcus sanguis* que en la de controles sanos [15] y los serotipos aislados son poco comunes y reúnen características especiales [16]. En algunos pacientes se observa una hipersensibilidad de causa desconocida a ciertos antígenos de este microorganismo y se han podido reproducir algunos síntomas de la enfermedad tras su inoculación en individuos sanos [17]. Estos antígenos comparten secuencias de aminoácidos con las proteínas de choque térmico (PChT) humano (especialmente con la de 60 kD) por lo que en sujetos sensibilizados por el *Streptococcus sanguis* la expresión de PChT secundaria al desarrollo de determinados procesos fisiológicos (infección, inflamación, etc.), podría desencadenar un proceso inflamatorio de naturaleza autoinmune que podría contribuir al desarrollo de la enfermedad [18, 19].

Algunos clínicos, aceptando el origen bacteriano de la enfermedad, trataron a pacientes con EB con agentes antimicrobianos y observaron una clara mejoría de la sintomatología mucocutánea y articular [20, 21]. También se ha descrito que la limpieza exhaustiva de la piel antes de la realización del test de patergia (test de hipersensibilidad cutánea) puede disminuir la frecuencia en la positividad del test [22].

Existen datos que sugieren que el virus del herpes simple de tipo 1 (VHS-1) también podría contribuir al desarrollo de la enfermedad. Los pacientes con EB presentan un incremento significativo en la frecuencia de aparición de anticuerpos anti-VHS-1 y de ADN del virus en el suero [23-26]. También se ha descrito una mayor actividad de linfocitos T contra el VHS-1 en este tipo de pacientes. Sin embargo, otros trabajos describen la ausencia de ADN del virus en

biopsias de úlceras orales o en leucocitos de pacientes con EB [27], lo que podría sugerir que el virus VHS-1 no es un único agente causal. En conexión con la teoría infecciosa del VHS-1, Sohn *et al.* realizó interesantes trabajos con el objetivo de desarrollar un modelo de laboratorio de la EB. En estos trabajos se comprobó que la inoculación del VHS-1 en ratones ICR (línea genéticamente estandarizada del *Institute of Cancer Research*) era capaz de producir lesiones similares a las que aparecen en la EB [28] y que esta sintomatología mejoraba claramente después de la administración del antiviral famciclovir [29]. Sin embargo, la implicación del VHS-1 en el desarrollo de la EB no es clara ya que la administración de Aciclovir, un agente antiviral eficaz en el tratamiento de la infección por VHS-1, no reportó ningún beneficio terapéutico en el tratamiento de la EB [30, 31].

- Factores genéticos

La incidencia de la EB es relativamente alta entre individuos de una misma familia [32-37]. Por otro lado, la enfermedad es poco frecuente en individuos de raza negra y en sujetos provenientes de áreas no mediterráneas de África. La mayoría de los pacientes son de origen mediterráneo, del oriente medio o del lejano oriente.

La distribución geográfica de la enfermedad se relaciona estrechamente con las áreas de población donde existe una alta prevalencia del alelo del antígeno leucocitario humano (HLA) B51. Este alelo, que forma parte del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo I (MHC-I), se presenta en cerca del 60% de los pacientes con EB [38-41]. El alelo HLA-B51 influye sobre la gravedad de la enfermedad ya que confiere un mayor riesgo para el desarrollo de uveítis [42] y la pérdida de la visión en pacientes con uveítis posterior [43]. También está asociado a la aparición de lesiones a nivel del Sistema Nervioso Central, manifestaciones cutáneas y úlceras genitales. Es bastante probable encontrar el alelo HLA-B51 en individuos afectados de una misma familia [44, 45] lo que le identifica como uno de los factores implicados en la afectación familiar. Sin embargo, la presencia del este alelo en hermanos no afectados por la EB [44, 46] demuestra la complejidad de la enfermedad y la posible influencia de múltiples genes y factores ambientales en su desarrollo.

Se han identificado variantes polimórficas de genes no relacionados con el MHC-I que podrían contribuir al desarrollo de la EB o al agravamiento de su sintomatología. Entre ellos se

encuentran los polimorfismos -1031C, -238A y -857T en la región promotora del gen del factor de crecimiento tumoral (TNF) [47], los polimorfismos en el gen de la fiebre mediterránea familiar (gen MEFV) [48-51], en el gen de la molécula de adhesión intercelular de tipo 1 (ICAM-1) [52-55] y en el gen de la sintasa endotelial del óxido nítrico [56-60].

- Alteraciones de la función de células del sistema inmune

En los pacientes con EB existen alteraciones en la inmunidad innata y en la adquirida. En estos pacientes se ha descrito una hipersensibilidad de los linfocitos T hacia diferentes antígenos y una respuesta inmune polarizada hacia Th1 cuya intensidad se correlaciona con la actividad de la enfermedad [61].

En la circulación y en las lesiones mucocutáneas de los pacientes con EB se observa un incremento de los linfocitos T- $\gamma\delta$ [62], un tipo de linfocito que parece estar involucrado en el desarrollo de enfermedades autoinmunes como el Lupus Eritematoso Sistémico y la Artritis Reumatoide [63]. Los linfocitos T- $\gamma\delta$ de pacientes con EB presentan una hiperreactividad hacia proteínas de algunos microorganismos de la mucosa oral, en particular hacia péptidos derivados de la PChT micobacteriana de 60 KD y las secuencias homólogas contenidas en la PChT humana de 65 KD [61, 62, 64], pudiendo contribuir al desarrollo de procesos autoinmunes secundarios a una reacción de sensibilidad cruzada. Este hecho podría relacionar a los linfocitos T- $\gamma\delta$ con el desarrollo de las úlceras orales, uno de los síntomas que aparece como primera manifestación en el 90% de los pacientes [65].

En la EB se observa una infiltración de neutrófilos en los tejidos afectados probablemente secundaria a un aumento en la actividad de estas células. Los neutrófilos de los pacientes con EB presentan un aumento de la quimiotaxis, la actividad fagocítica y la producción mieloperoxidasa y de iones superóxido lo que contribuye al daño tisular [64, 66, 67]. La causa de esta hiperactividad de los neutrófilos no es clara aunque se ha relacionado con un incremento en los niveles plasmáticos de TNF- α , IL-1 β e IL-8.

Las células presentadoras de antígenos podrían estar involucradas en el aumento de los niveles de los linfocitos T- $\gamma\delta$ y en la hiperreactividad de los neutrófilos observada en la EB ya

que son importantes productoras de IL-12 e IL-18, potentes estimulantes de los linfocitos T- $\gamma\delta$ y de los neutrófilos respectivamente [61].

- Trombofilia

La EB está asociada a un estado protrombótico de causa desconocida [18, 68, 69]. Se observa una mayor incidencia de eventos trombóticos a nivel venoso, particularmente en los vasos de gran calibre aunque pueden ocurrir a nivel de todo el sistema vascular [70]. La sintomatología trombótica es variada, desde oclusión de la vena hepática [71], trombosis venosa intracranial [72], trombosis de la vena mesentérica [73], iliaca [73], pulmonar [73] o renal [72] hasta compromiso a nivel arterial con trombosis e infarto arterial coronario [73], infarto a nivel de la retina y atrofia del nervio óptico secundarios a vasculitis oclusiva.

Recientemente un meta-análisis de Chamorro *et al.* [74] evaluó los datos de 27 estudios de trombofilia en pacientes con EB en los que se determinó la asociación entre la incidencia de eventos trombóticos y la presencia de la mutación G1691A del gen del factor V (factor V Leiden), la mutación G20210A del gen de la protrombina y la mutación C677T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa. En este estudio se observó un incremento del riesgo de trombosis debido a la presencia del factor V Leiden, pero en una forma similar a la encontrada en la población general. Otros factores de riesgo trombofílicos clásicos tales como la deficiencia en la proteína C, proteína S o antitrombina III (AT-III) también han sido estudiados en los pacientes con EB sin que se haya observado una prevalencia superior a la encontrada en la población sana [75-80].

En cuanto a las alteraciones en la cascada de la coagulación o en la fibrinólisis, los datos indican una activación de ambos sistemas en los pacientes con EB con o sin trombosis aunque en algunos casos los resultados son contradictorios. Se han descrito niveles incrementados del complejo trombina-antitrombina III y del fragmento 1+2 de la protrombina que indican una activación de la coagulación en estos pacientes [81-83]. También se ha descrito un aumento en los niveles antigénicos y de actividad del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y una correlación con la actividad de la enfermedad [69], una disminución en los niveles del activador tisular del plasminógeno (tPA) [84], o un defecto en la formación del complejo formado por el tPA y el PAI-1 [68], lo que podría indicar la existencia de una alteración en el

sistema fibrinolítico. Asimismo se han descrito incrementos en los niveles séricos de homocisteína pero en el momento de establecer su relación con el estado protrombótico los resultados son contradictorios [85-88].

La activación y/o el daño endotelial (vasculitis) podría ser un factor desencadenante de la sintomatología protrombótica observada en la EB [82, 89]. En estos pacientes se han encontrado niveles incrementados de E-selectina (CD62E) soluble (sCD62E) [90-93], un marcador específico del daño o la activación endotelial. Aunque no se ha podido confirmar una asociación entre el estado protrombótico y el aumento en los niveles de sCD62E en la EB, sí se ha podido demostrar que los niveles de este marcador se correlacionan de forma significativa con la velocidad de sedimentación eritrocitaria, los valores de la proteína C reactiva [93] y la actividad de la enfermedad [94]. Esto podría indicar que el ambiente proinflamatorio presente durante el curso de la enfermedad podría originar una activación/daño del endotelio que contribuiría al desarrollo de eventos trombóticos.

Entre los mecanismos relacionados con el daño y/o activación endotelial en la EB se encuentran la presencia de anticuerpos contra las células endoteliales [95-97], la existencia de una hiperreactividad de los neutrófilos [97], un incremento del estrés oxidativo [89, 98], un aumento en los niveles de la dimetilarginina asimétrica [99], inhibidor endógeno de la sintasa del óxido nítrico que está muy relacionado con la alteración de la función endotelial en diversas patologías [100, 101]; y un incremento en los niveles de homocisteína debido probablemente a la deficiencia de folatos secundaria al aumento de su consumo durante el desarrollo de procesos inflamatorios crónicos como el que se observa en la EB [86, 102-104].

Se ha descrito un aumento en la activación del receptor de fibrinógeno plaquetario antes y después de la estimulación por adenosín difosfato (ADP) en pacientes con EB [105]. Esto sugiere que en la enfermedad podría existir un aumento en la actividad plaquetaria en condiciones basales así como una hiperreactividad plaquetaria frente al estímulo. También se ha encontrado que en pacientes con EB e historia de trombosis existe un aumento significativo en la exposición de P-selectina (CD62P) plaquetaria y en la formación de microagregados de origen plaquetario [106]. En conjunto estos hallazgos sugieren que en la EB existe un aumento en la actividad plaquetaria que podrían contribuir al estado protrombótico observado en la enfermedad.

1.1.4 Manifestaciones clínicas

La EB se desarrolla con síntomas más graves en el sexo masculino aunque la prevalencia es similar en ambos géneros. Aparece por lo general en la tercera década de la vida desarrollándose completamente a los 15 meses del primer brote con períodos alternos de actividad y de remisión.

La sintomatología es variada y algunos estudios sugieren que guarda relación con el origen étnico del paciente [107]. Es característica la presencia de manifestaciones mucocutáneas (úlceras, eritema nudoso, lesiones acneiformes e hiperreactividad cutánea), oculares y articulares aunque también puede aparecer afectación a nivel del sistema circulatorio, digestivo, pulmonar, muscular y neurológico.

La sintomatología más frecuente es la presencia de úlceras en la cavidad oral. Pueden observarse hasta en el 100% de los casos [65, 108] y constituye la sintomatología inicial en un 90% de los pacientes [65]. Las áreas más afectadas son la mucosa oral, los labios, la lengua, las encías y el paladar blando [109].

Las úlceras genitales aunque menos frecuentes, son más específicas de la enfermedad [6]. Se observan en un 50-88% de los pacientes y remiten tras su aparición entre los 10-30 días en la mayoría de los casos. En los hombres son más comunes en la zona del escroto mientras que en las mujeres aparecen con mayor frecuencia en la zona de los labios mayores y/o menores [39].

Las lesiones en la piel aparecen entre el 38% y el 99% de los pacientes, dependiendo de la zona geográfica. Entre las más habituales se encuentran las lesiones nodulares (eritema nodoso y tromboflebitis superficial) y las lesiones papulopustulosas. El eritema nodoso se observa aproximadamente en el 50% de los casos y es más frecuente en mujeres. Las lesiones suelen desaparecer en el transcurso de 2-3 semanas tras el inicio dejando una pigmentación residual en las zonas afectadas [39, 110]. Las lesiones papulopustulosas o acneiformes no se diferencian del acné común ni clínica ni histológicamente aunque su aparición es más habitual en la zona del tronco y las extremidades [111].

Hasta un 70% de los pacientes con EB presentan un test de patergia positivo. El test de patergia evalúa la respuesta al daño de la piel tras un pinchazo con una aguja estéril. El test se considera positivo cuando aparece una pústula en el lugar del pinchazo. El porcentaje de pacientes con el test de patergia positivo varía en función de la situación geográfica y es mayor en pacientes que provienen de áreas de alta prevalencia de la enfermedad [112]. A todo lo anterior habría que añadir que algunos estudios recientes indican una disminución en la frecuencia de aparición del test de patergia positivo, hecho que se relaciona con la mejora de las condiciones sanitarias e higiénicas de los pacientes [113].

La causa más importante de morbilidad en la EB es la afectación ocular, principalmente cuando es debida a un evento isquémico local. Ésta afecta al 50%-70% de los hombres y entre un 20%-30% de las mujeres con EB, sin que se conozca la causa de esta diferenciación por género. La lesión ocular más grave es la panuveítis bilateral cicatrizante que puede evolucionar a ceguera, especialmente en hombres jóvenes sin tratamiento. También puede aparecer iritis, uveítis posterior, neuritis del nervio óptico e hipopion. Las lesiones oculares pueden presentar infiltración de leucocitos a nivel vascular, perivasculitis retinal oclusiva y trombosis. Durante los períodos de actividad de la enfermedad podemos encontrar infiltración de neutrófilos en la cámara anterior del ojo, en el epitelio corneal, en el iris, en el cuerpo ciliar y en la coroides.

La afectación neurológica aparece en el 3-25% de los pacientes y constituye otra de las manifestaciones más graves de la enfermedad [114]. La lesión del parénquima cerebral puede afectar hasta a un 80% de los casos [114]. En estos pacientes se observan signos piramidales, hemiparesia, alteración de la funcionalidad de los esfínteres y cambios del comportamiento.

Cerca de la cuarta parte de los pacientes desarrollan manifestaciones vasculares [70]. Los eventos vasculares aparecen en vasos de todos los calibres [115] aunque parece haber predilección por el sistema venoso. La complicación más grave es el aneurisma de la arteria pulmonar que por lo general está asociado a eventos trombóticos de la vena cava inferior y el sistema iliaco-femoral.

1.1.5 Pronóstico

El pronóstico de la enfermedad es bueno pasado los años iniciales. Las lesiones a nivel de la piel, mucosas y la artritis aparecen de forma recurrente y raramente desembocan en eventos serios. Estas manifestaciones suelen atenuarse con el paso del tiempo.

La afectación ocular afecta aproximadamente al 50% de los pacientes. Suele debutar en los primeros años de la enfermedad en los que además la sintomatología es más grave. Entre los factores de mal pronóstico se encuentran: sexo masculino, historia de ataques frecuentes, compromiso posterior de la cavidad ocular y alta opacidad vítrea. Aunque el pronóstico de la enfermedad ocular en el pasado contemplaba la pérdida total de la visión en el transcurso de los tres años siguientes al diagnóstico, numerosos estudios recientes describen un mejor pronóstico.

La trombosis venosa profunda es la manifestación vascular más frecuente y por lo general la primera en aparecer. Entre las afectaciones a nivel venoso, el síndrome de Budd-Chiari (trombosis de las venas suprahepáticas) tiene el peor pronóstico. La enfermedad arterial se manifiesta principalmente en forma de aneurismas siendo el aneurisma de la arteria pulmonar una de las complicaciones más graves que deriva en algunos casos en muerte por hemoptisis masiva.

1.1.6 Tratamientos

El objetivo principal del tratamiento es evitar el daño irreversible que tiene lugar, sobre todo, en el primer período de la enfermedad y en los hombres jóvenes, subgrupo de mayor riesgo de tener complicaciones. También persigue disminuir el recrudecimiento de las manifestaciones mucocutáneas y articulares que, a pesar de no causar daños graves, disminuyen apreciablemente la calidad de vida de los pacientes [107, 116].

Debido a la expresión heterogénea de la enfermedad, los protocolos de tratamiento varían en función del área afectada y de la gravedad de los síntomas. A grandes rasgos, el tratamiento consiste en la administración sola o combinada de agentes con actividad inmunosupresora y/o anti-inflamatoria.

Los glucocorticoides son ampliamente utilizados para el tratamiento de la sintomatología ocular, vascular, neurológica y gastrointestinal. Sin embargo presentan efectos adversos importantes tales como catarata y glaucoma, y son poco eficaces en el tratamiento de úlceras genitales y orales lo que en conjunto limitan su uso [117].

La colchicina se utiliza en el control de la lesiones mucocutáneas (principalmente en el eritema nodoso) y en la artritis [118].

Para la enfermedad ocular es frecuente la utilización de ciclosporina A [119] (contraindicada en el caso de afectación neurológica) y azatioprina (primer agente de elección), esta última también eficaz en el tratamiento de la artritis y las lesiones ulcerosas [120].

Los inhibidores del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) tales como el infliximab y el etanercept, son utilizados en combinación con otros agentes inmunosupresores para el control de la sintomatología grave refractaria a otros tratamientos [118].

El interferón (INF) α se utiliza en el tratamiento de la sintomatología mucocutánea, ocular, articular, vascular y neurológica [118].

La ciclofosfamida es empleada en el compromiso neurológico, la trombosis venosa profunda y los aneurismas periféricos y pulmonares [118].

1.1.7 Modelos animales de la enfermedad

En 1979 Hori *et al.* desarrollaron un modelo animal de la EB mediante la administración durante un año de productos químicos agrícolas a cerdos Pitman-Moor [121]. Aunque todos los animales incluidos en el estudio desarrollaron lesiones similares a las que aparecen en la EB, la aplicación de este protocolo es compleja, lo que dificulta su utilización.

En 1994, Stanford *et al.* utilizaron la infusión de secuencias peptídicas de la proteína de choque térmico humana de 60 KD y de micobacterias para la obtención de un modelo de la

enfermedad en ratas Lewis [122]. Sin embargo sólo se observó afectación ocular (uveítis) en los animales tratados por lo que la utilidad de este protocolo es limitada.

En 1998 el grupo de Sohn desarrolló el modelo de EB que es actualmente el más utilizado [28]. Estos investigadores reprodujeron en ratones ICR una sintomatología muy similar a la que aparece en la EB mediante la inoculación del VHS-1. Este modelo animal ha sido utilizado ampliamente en el estudio de la etiopatogenia de la EB así como en la eficacia y la seguridad de diferentes terapias [13, 29, 31, 112, 123, 124].

1.2 Inflamación

La inflamación es la respuesta del organismo al daño causado por agentes microbianos, biológicos, químicos, físicos o mecánicos. Está integrada por numerosas vías moleculares de transmisión de señales que persiguen el reclutamiento e instrucción de numerosos tipos celulares con el objeto de controlar y prevenir el daño así como de reparar los tejidos lesionados.

A continuación se desarrollan las características de algunas de las moléculas involucradas en los procesos inflamatorios cuya participación en la EB ha sido uno de los objetivos de este trabajo de tesis doctoral.

1.2.1 CD40, CD40 ligando y CD40 ligando soluble

El CD40 es una proteína transmembrana de tipo I que pertenece a la familia del receptor del TNF. Se localiza de forma constitutiva en la superficie de los linfocitos, los monocitos, los macrófagos, los mastocitos, las células dendríticas, los basófilos, los eosinófilos, las células del músculo liso, las células mesenquimales, las células epiteliales y las plaquetas [125-130].

La expresión del CD40 puede ser inducida por varias moléculas como el CD40 ligando (CD40L o CD154), el más conocido de los ligandos del CD40, y las citocinas pro-inflamatorias como la interleucina (IL)-1, la IL-3, la IL-4, el INF- γ y el TNF- α [125]. Aunque el CD40 no tiene dominios con actividad quinasa, la activación del receptor inicia señales intracelulares que originan la activación de varias proteína quinasas entre las que se encuentran la

fosfatidilinositol-3 quinasa [131], la fosfolipasa $\text{C}\gamma 2$ [131] y varias proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAP quinasas) [132-134]. La mayoría de estos eventos requiere la asociación entre el CD40 y los miembros de la familia del TRAF (factor asociado al receptor del TNF) [135-141].

El CD40L es el ligando más conocido del CD40. Es una proteína transmembrana de tipo II que forma parte de la familia del TNF. Se expone principalmente en la superficie de linfocitos T CD4^+ activados y de plaquetas activadas aunque también puede localizarse en la superficie de otras células como los monocitos, las células NK, los linfocitos B, los linfocitos T CD8^+ , los mastocitos y los basófilos. Una vez expuesto en la superficie, el CD40L puede ser escindido y liberado hacia el espacio extracelular. A esta forma del CD40L se le denomina CD40L soluble (sCD40L) [142].

La interacción CD40/CD40L genera un conjunto de señales intracelulares que estimula la secreción de numerosos mediadores y la síntesis de proteínas de membrana que participan en la inmunidad humoral, celular y en la inflamación. Los primeros efectos descritos y mejor conocidos del sistema CD40/CD40L son la proliferación, la diferenciación y el cambio de clase de inmunoglobulina del linfocito B. También participa en la estimulación de las células presentadoras de antígeno y del linfocito T [125].

Las plaquetas constituyen el mayor reservorio de sCD40L en la sangre ya que aportan el 95% del sCD40L plasmático [143]. Este hecho ha aumentado el interés en la participación de las plaquetas en los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune. El CD40L plaquetario tiene origen en los megacariocitos y se almacena en sus gránulos alfa [144]. Numerosos activadores plaquetarios tales como la trombina, el colágeno, el péptido agonista del receptor de trombina (TRAP) y el ADP estimulan la exposición del CD40L en la superficie de las plaquetas [128]. La activación de las plaquetas por el endotelio inflamado también estimula la exposición del CD40L en la superficie de la plaqueta y la liberación de sCD40L hacia el espacio extracelular [145]. Algunos estudios indican que en el mecanismo de liberación del sCD40L en la plaqueta participan el CD40 [146], la GPIIb/IIIa [147-149] y las metaloproteinasas de origen plaquetario [147, 148, 150, 151]. Una vez liberado, el sCD40L forma homotrímeros que se unen al CD40 para ejercer sus efectos biológicos. En la figura 1 se representan algunos de los efectos de la interacción CD40/CD40L en diferentes tipos celulares.

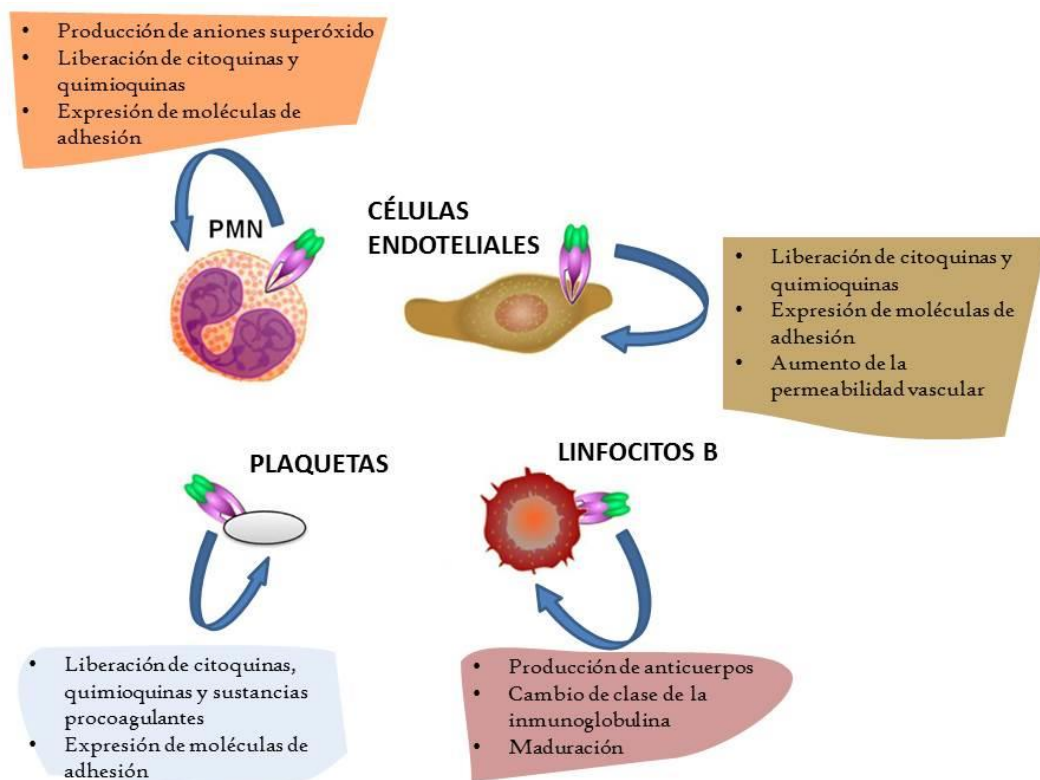


Figura 1: Efectos de la interacción CD40/CD40L en leucocitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliales, plaquetas y linfocitos B.

La unión del sCD40L al CD40 de las células endoteliales puede tener un efecto proinflamatorio y protrombótico ya que estimula la síntesis y secreción de IL-8, IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , metaloproteasa (MMP)-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9 por el endotelio a la vez que promueve la expresión endotelial de moléculas de adhesión tales como la ICAM-1, la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) y la exposición de CD62E y factor tisular (FT). Además, la activación del receptor CD40 en fibroblastos incrementa los niveles de ciclooxygenasa COX-2 y la expresión y secreción de la prostaglandina E₂. Todos ellos en combinación contribuyen a la inflamación y a la destrucción del tejido diana [152, 153].

Recientemente se ha descrito la secreción de factores de crecimiento endoteliales con actividad angiogénica en respuesta a la estimulación por CD40L. Este hallazgo indica que el CD40L podría participar en la remodelación vascular y la formación de nuevos vasos [154, 155].

Algunos estudios en ratones han demostrado que el sistema CD40/CD40L puede estar involucrado en la aparición de una gran variedad de enfermedades autoinmunes y que la inhibición de la señal CD40/CD40L puede prevenir el desarrollo de este tipo de patologías [156]. En humanos se ha observado un aumento en los niveles de sCD40L en diversas enfermedades que cursan con afectación vascular como la aterosclerosis [157], la diabetes [158] o el síndrome coronario agudo [72, 73]. También se ha encontrado elevado en ciertas enfermedades inflamatorias crónicas como el lupus eritematoso sistémico [159] y la enfermedad de Crohn [160]. En la artritis reumatoide se ha descrito una mayor expresión de CD40L en linfocitos T CD4⁺ que está asociada a una mayor actividad de la enfermedad [111]. Todo lo anterior son datos que indican la posible implicación del sistema CD40/CD40L en el desarrollo de enfermedades inflamatorias que, como la EB, pueden tener un componente autoinmune.

1.2.2 Metaloproteasas

Las metaloproteasas (MMPs) son una familia de metaloendopeptidasas que contienen zinc. Son producidas por numerosos tipos celulares que las mantienen ancladas a su superficie o las liberan al espacio extracelular. Las MMPs se pueden clasificar como: gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13 y MMP-14), estromelisin (MMP-3, MMP-10 y MMP-11), matrilisinas (MMP-7 y MMP-26) y MMPs de membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16 y MMP-24). Existe un último grupo de MMPs difíciles de clasificar que incluyen a la MMP-12 (metaloelastasa expresada fundamentalmente en macrófagos), la MMP-19, la MMP-20, la MMP-22, la MMP-23 y la MMP-28.

Las MMPs están involucradas fundamentalmente en los procesos de remodelación tisular y en los mecanismos inflamatorios. Como parte principal de su función, las MMPs contribuyen al procesamiento de numerosas citocinas y quimioquinas, y degradan componentes de la matriz extracelular facilitando el reclutamiento de células del sistema inmune hacia los tejidos diana.

Los niveles de las MMPs están fuertemente regulados mediante la participación de varios puntos de control que incluyen: la transcripción, la activación de sus zimógenos, la interacción con las proteínas de la matriz extracelular y la interacción con sus inhibidores tisulares.

La alteración en los niveles de MMPs y sus inhibidores está involucrada en enfermedades inflamatorias tales como la enfermedad inflamatoria intestinal y la periodontitis [161]. En este contexto, algunos trabajos indican una actividad anti-inflamatoria de la MMP-2 y un efecto pro-inflamatorio de la MMP-9 [162, 163]. En la colitis, la MMP-2 protege contra el daño tisular y mantiene la función barrera del intestino mientras que la MMP-9 derivada del epitelio ejerce un estímulo pro-inflamatorio [164]. Por este motivo los niveles de MMP-2 y MMP-9 se han utilizado como variables pronóstico en esta enfermedad [164].

La relación entre los niveles de MMP-9 y la alteración vascular ha sido reportada en algunas vasculitis [165, 166]. En la EB se ha observado un aumento en los niveles de MMP-9 [167] y un efecto pro-inflamatorio de esta MMP lo que podría sugerir su participación en la alteración vascular asociada a la EB [168].

1.2.3 Selectinas

Las selectinas (antígeno de diferenciación CD62) son glicoproteínas transmembrana de tipo I que reconocen oligosacáridos de glicoproteínas y glicolípidos en la superficie de las células.

En su estructura contienen, comenzando por el dominio N-terminal, un dominio tipo lectina dependiente de calcio, un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico, varias repeticiones consenso cuyo número varía en función del tipo de selectina, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática (figura 2).

Las selectinas participan en mecanismos involucrados en la defensa inmunitaria, la hematopoyesis, la hemostasia y la inflamación. Median la interacción entre numerosos tipos de células entre las se incluyen las plaquetas, las células endoteliales y los leucocitos.

Se conocen tres tipos: la P-selectina, la E-selectina y la L-selectina. La P-selectina (CD62P) es la selectina de mayor peso molecular. Se almacena en las membranas de los gránulos alfa de las plaquetas [169] y en los cuerpos de Weibel–Palade de las células endoteliales [170, 171]. Aparece en la superficie de las células endoteliales y de las plaquetas cuando están activadas y constituyen un antígeno específico de la activación plaquetario. La función más conocida de la

P-selectina es la de mediar la interacción entre las células endoteliales, las plaquetas y los leucocitos durante la inflamación [169].

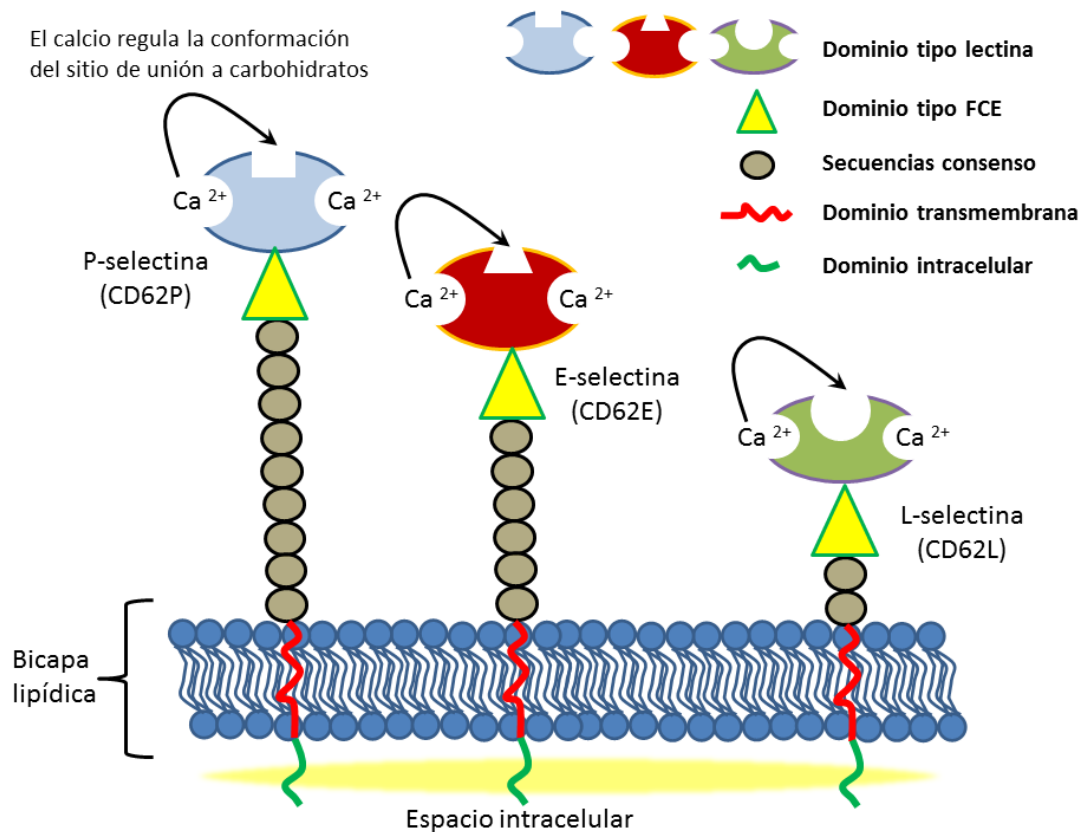


Figura 2: Representación de la estructura de la P-selectina, la E-selectina y la L-selectina. FCE: factor de crecimiento epidérmico.

El ligando mejor definido de la P-selectina es el ligando glicoprotéico-1 de la P-selectina (PSGL-1, del inglés “**P**-selectin glycoprotein ligand 1”), una sialomucina homodimérica localizada en la superficie de la mayoría de los leucocitos [169] que también es ligando para la E-selectina y la L-selectina [172]. El PSGL-1 también se encuentra en la superficie de las plaquetas y permite el mecanismo de rodamiento de la plaqueta sobre la superficie de las células endoteliales activadas [173, 174]. La glicoproteína (GP) plaquetaria GPIb α , subunidad del receptor para el factor (F) de von Willebrand (FvW), es otro ligando de la P-selectina y constituye un mecanismo adicional de interacción entre las plaquetas y las células endoteliales

activadas que contribuye al reclutamiento de las plaquetas en las zonas afectadas del endotelio [175] (figura 3).

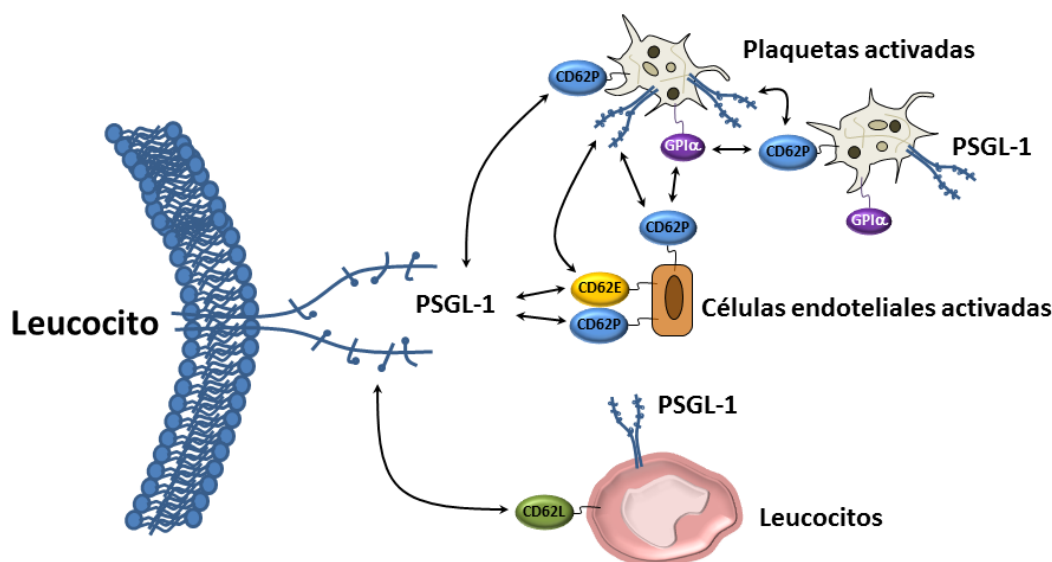


Figura 3: Comunicación entre leucocitos, células endoteliales activadas y plaquetas activadas mediante la interacción entre la P-selectina (CD62P), la E-selectina (CD62E), la L-selectina (CD62L) y el ligando PSGL-1.

Existe una forma soluble de la P-selectina, la P-selectina soluble (sCD62P). La sCD62P se encuentra aumentada en los estados protrombóticos de consumo tales como la coagulación intravascular diseminada, la púrpura trombocitopénica trombótica y la trombocitopenia inducida por heparina [176, 177]. Se han descrito también aumentos de la sCD62P en la enfermedad arterial coronaria, en la diabetes, en la hipertensión, y en la fibrilación auricular [178]. De hecho, el aumento en los niveles de la sCD62P constituye un marcador predictivo de enfermedad cardiovascular e infarto agudo de miocardio [179].

Tanto la P-selectina como la sCD62P incrementan la producción de fibrina y el tamaño del trombo. Existen datos que indican que este efecto podría deberse principalmente a la capacidad de estas moléculas de estimular la expresión de FT en los monocitos [180] y la producción de micropartículas ricas en FT por estas células [181], ambos procesos mediados por el ligando PSGL-1 presente en la superficie de los monocitos [182]. Una vez en el torrente circulatorio, las micropartículas son reclutadas por las plaquetas activadas de la superficie del trombo contribuyendo a la formación de trombina gracias al aporte adicional de FT y de una

superficie fosfolipídica procoagulante. Además, estas micropartículas estimulan la exposición de FT en la superficie de las células endoteliales lo que en conjunto podría promover la producción de trombina y el depósito de fibrina aumentando la estabilidad de tapón hemostático. El reclutamiento de micropartículas hacia la zona afectada no sólo contribuye a la formación de un trombo más estable sino que también protege frente a una coagulación intravascular diseminada al disminuir el potencial procoagulante total derivado de la presencia de estas micropartículas en sangre [182, 183].

En la EB se ha descrito una mayor concentración plasmática de sCD62P en pacientes con mayor actividad de la enfermedad [184]. Sin embargo otros estudios sugieren que el aumento en los niveles de sCD62P en la EB parece estar más relacionado con la presencia de eventos trombóticos [185] que con la actividad de la enfermedad por lo que el sCD62P no constituye un buen marcador para evaluar la gravedad de la enfermedad ni el daño endotelial asociado a la misma.

La CD62E se expresa en condiciones basales en los vasos de la mucosa bronquial y en el endotelio de los microvasos de la piel y del hueso [186-188]. Sin embargo en otros órganos la CD62E se expresa sólo en respuesta a estímulos inflamatorios derivados principalmente de la acción de la IL-1, el TNF- α , la IL-10 [189-191]. Es por ello que la elevación en los niveles plasmáticos de sCD62E constituye un marcador específico de activación o daño endotelial [186, 192]. Se han descrito aumentos en los niveles de sCD62E en la hipertensión [193, 194], la diabetes [195-199], en estados que cursan con dislipemia [200, 201], en la obesidad [202-204] y en fumadores [205-207]. Los hombres presentan mayores niveles que las mujeres sin que la edad sea un factor determinante [204, 208, 209]. Sin embargo se ha comprobado que en las mujeres posmenopáusicas los niveles de sCD62E se acercan a los encontrados en el hombre [210] por lo que este efecto podría deberse a un componente hormonal [211-214]. Se han descrito varios polimorfismos del gen de la CD62E. Los polimorfismos S128R [215, 216] y G98T [217] están asociados a la aparición temprana y severa de la aterosclerosis mientras que el polimorfismo R84A origina un aumento en la adhesión y en el rodamiento leucocitario [218].

En la EB existe una vasculitis que afecta a los vasos de todos los calibres [97, 219, 220] incluso en pacientes que no presentan signos o síntomas de afectación vascular [82]. En este punto la sCD62E cobra un interés especial. Así algunos estudios han encontrado niveles

elevados de sCD62E en el plasma de pacientes con EB en su fase activa [90-93] y una correlación entre los niveles de sCD62E y la actividad de la enfermedad [221]. Esto indica claramente que el endotelio es un tejido diana involucrado en los mecanismos fisiopatológicos de esta enfermedad y que el nivel en sangre de sCD62E es un marcador fiable del daño endotelial que la acompaña.

La L-selectina (CD62L) es la selectina de menor peso molecular y se encuentra en la superficie de los granulocitos, los monocitos y los linfocitos en su estado basal. Esta selectina tiene un papel esencial en los mecanismos de adhesión, rodamiento y captura de los leucocitos por la pared vascular facilitando su migración hacia los tejidos cercanos durante la vigilancia inmunológica y la inflamación [222, 223]. Una característica funcional que distingue a la L-selectina de los otros subtipos es la de permitir la recirculación y localización de los linfocitos en los ganglios linfáticos [224-226].

1.2.4 Fibrinógeno

El fibrinógeno es una glicoproteína plasmática de 340 kDa que se sintetiza en los hepatocitos. Está formada por 6 pares de cadenas polipeptídicas unidas a través de 29 puentes disulfuro. La función más conocida del fibrinógeno es su participación en la coagulación a través de su conversión a fibrina por la trombina [227]. También es conocido por ser un reactante de fase aguda [228].

La formación de la red polimérica de fibrina es uno de los eventos más importantes involucrados en el control del sangrado (hemostasia) y en la trombosis, por lo que los cambios en la estructura del fibrinógeno pueden originar alteraciones funcionales que den lugar a una condición patológica [229].

La fortaleza del coágulo medido por tromboelastometría se incrementa con el aumento en los niveles de fibrinógeno [230-232]. Además, los niveles de fibrinógeno pueden modificar la generación de trombina a bajas concentraciones de FT ya que puede competir con el FVIII por el exosito I de la trombina, retrasando la activación de este factor. Por otro lado, el aumento en la concentración de fibrinógeno facilita la formación de fibrina que al unirse a la trombina la protege de la acción de la AT-III lo que prolonga su actividad y sus efectos. Este efecto dual del

fibrinógeno se ha podido demostrar mediante la trombinografía calibrada automatizada (CAT, del inglés: *Calibrated Automated Thrombogram*) en la que se ha observado que un aumento en los niveles de fibrinógeno retrasa la generación de trombina a la vez que aumenta tanto la concentración máxima de trombina que se alcanza como la cantidad total de trombina que se genera [233, 234].

1.3 Hemostasia

La hemostasia está formada por un conjunto de mecanismos que, tras la lesión de la pared vascular, impiden o detienen la salida de la sangre hacia el espacio extravascular a la vez que mantienen la fluidez de la sangre y su circulación normal a través de los vasos sanguíneos. Durante este proceso también tiene lugar la activación de mecanismos inflamatorios y de reparación que contribuyen a mantener la integridad de la pared vascular después de la lesión.

Para facilitar su estudio, la hemostasia se puede dividir en 3 procesos principales: la hemostasia primaria (vasoconstricción y adhesión plaquetaria con formación de un coágulo plaquetario inestable), la hemostasia secundaria (coagulación y retracción del coágulo) y la fibrinólisis.

1.3.1 Hemostasia primaria

Tras la pérdida de la continuidad de la pared vascular, se produce un espasmo vascular reflejo mediado por el Sistema Nervioso Simpático cuyas terminaciones nerviosas recubren la pared del vaso. La vasoconstricción resultante reduce el diámetro del vaso y limita el flujo de sangre que llega al área afectada contribuyendo temporalmente a una disminución en la pérdida de sangre. Al mismo tiempo numerosos componentes de la matriz subendotelial tales como el colágeno, el FvW unido al colágeno y el FT de la superficie de fibroblastos y pericitos del subendotelio, entran en contacto con los componentes de la sangre activando numerosos mecanismos hemostáticos. En pocos segundos las plaquetas circulantes interaccionan con el FvW unido al colágeno de la matriz subendotelial a través del complejo plaquetario formado por las glicoproteínas (GP) GPIb-V-IX. Esta unión, aunque relativamente débil, es importante ya que facilita la interacción entre la GPVI y el colágeno de la matriz subendotelial sobre todo en aquellos vasos sanguíneos donde la velocidad de flujo es alta. La alteración de la función o

ausencia del receptor GPIb-V-IX origina el Síndrome de Bernard-Soulier, una condición que se asocia a sangrados importantes lo que demuestra la importancia de este receptor. La interacción GPVI-colágeno activa la secreción de mediadores plaquetarios como la serotonina y el tromboxano A₂ que contribuyen a la vasoconstricción de la zona afectada, y el difosfato de adenosina (ADP) que promueve la activación y el reclutamiento de nuevas plaquetas hacia el lugar de la lesión. También activa el paso a un estado de mayor afinidad de las integrinas plaquetarias $\alpha 2\beta 1$ (receptor de colágeno), $\alpha 5\beta 1$ (receptor de fibronectina), $\alpha 6\beta 1$ (receptor de laminina y $\alpha \text{IIb}\beta 3$ (receptor de fibrinógeno, que también une FvW y fibronectina) que permiten la adhesión firme de la plaqueta a la matriz subendotelial.

La agregación plaquetaria es fundamental para la formación del tapón hemostático primario. El fibrinógeno es el principal mediador de la agregación plaquetaria por ser el ligando que se une con mayor afinidad a la integrina plaquetaria $\alpha \text{IIb}\beta 3$ y por ser una de las proteínas más abundantes del plasma. Además, el fibrinógeno es una proteína dimérica que permite la formación de los puentes interplaquetarios responsables de la agregación.

El mecanismo de activación del receptor de fibrinógeno (integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$) ha sido objeto de especial atención por numerosos laboratorios en los últimos años [235, 236]. La activación plaquetaria por los agonistas de sus receptores de superficie (receptores purinérgicos, adrenérgicos, activados por proteasas, etc) genera una señalización intracelular que involucra elementos de las rutas clásicas de transducción de señales tales como las proteínas G y las tirosina quinasas que promueven la activación de fosfolipasa C, cambios del calcio citosólico y la activación de otras proteínas quinasas intracelulares como la proteína quinasa C. Como resultado se producen señales de origen intracelular que se denominan “inside-out” que provocan un cambio conformacional del receptor de fibrinógeno y un aumento de la afinidad por su ligando.

La unión del fibrinógeno a su receptor inicia un proceso de señalización “outside-in” que genera una cascada de sucesos tales como el agrupamiento de las integrinas y la formación de estructuras conocidas como contactos focales. Estos ensamblajes proteicos tienen un importante papel en la modulación de la adhesión celular, la secreción y en la inducción de los cambios morfológicos implicados en la extensión y locomoción celular (figura 4).

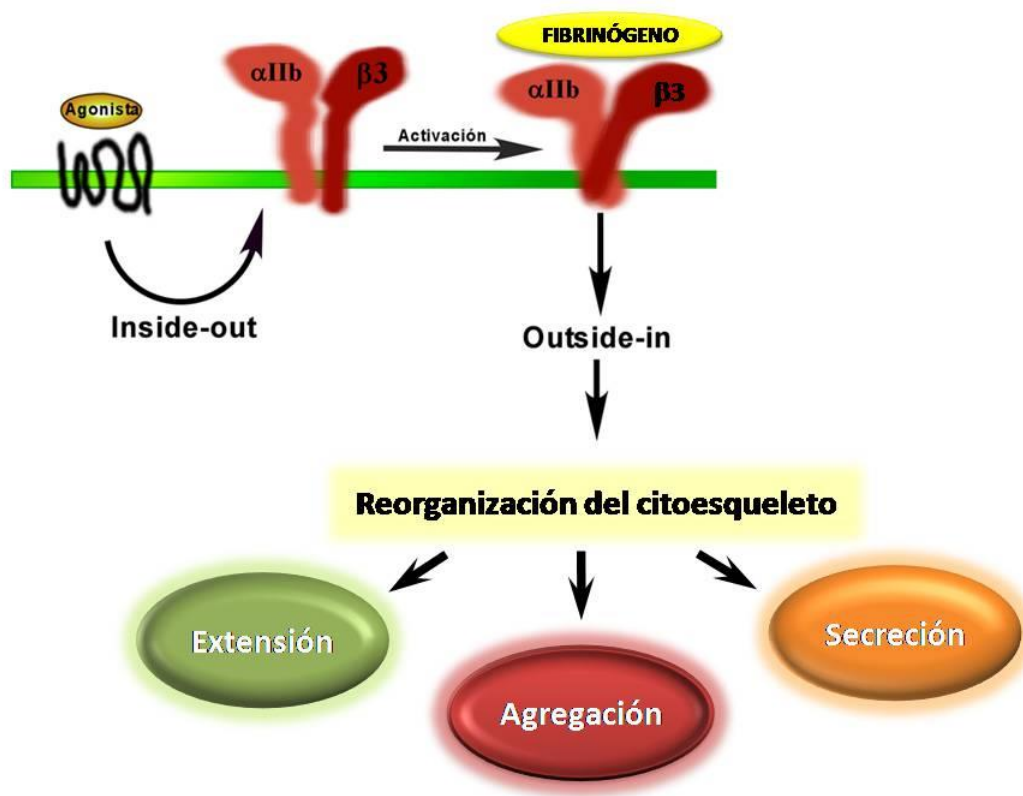


Figura 4: Efecto de agonistas (señal *inside-out*) sobre la activación del receptor de fibrinógeno plaquetario y generación de señales hacia el interior de la célula (señal *outside-in*). Como consecuencia se activan numerosos procesos plaquetarios como la agregación, la secreción de sustancias proactivas y la extensión del cuerpo celular para la emisión de pseudópodos, la locomoción y la adhesión plaquetaria.

El fibrinógeno del plasma y el FvW liberado por el endotelio lesionado y las plaquetas activadas, facilitan la formación de un tapón hemostático primario (figura 5). Sin embargo, el tapón hemostático es inestable (3-5 minutos) y debe ser fortalecido para que detenga eficazmente la hemorragia. El fortalecimiento del coágulo se logra a través de la *hemostasia secundaria* mediante la formación de una malla insoluble de fibrina.

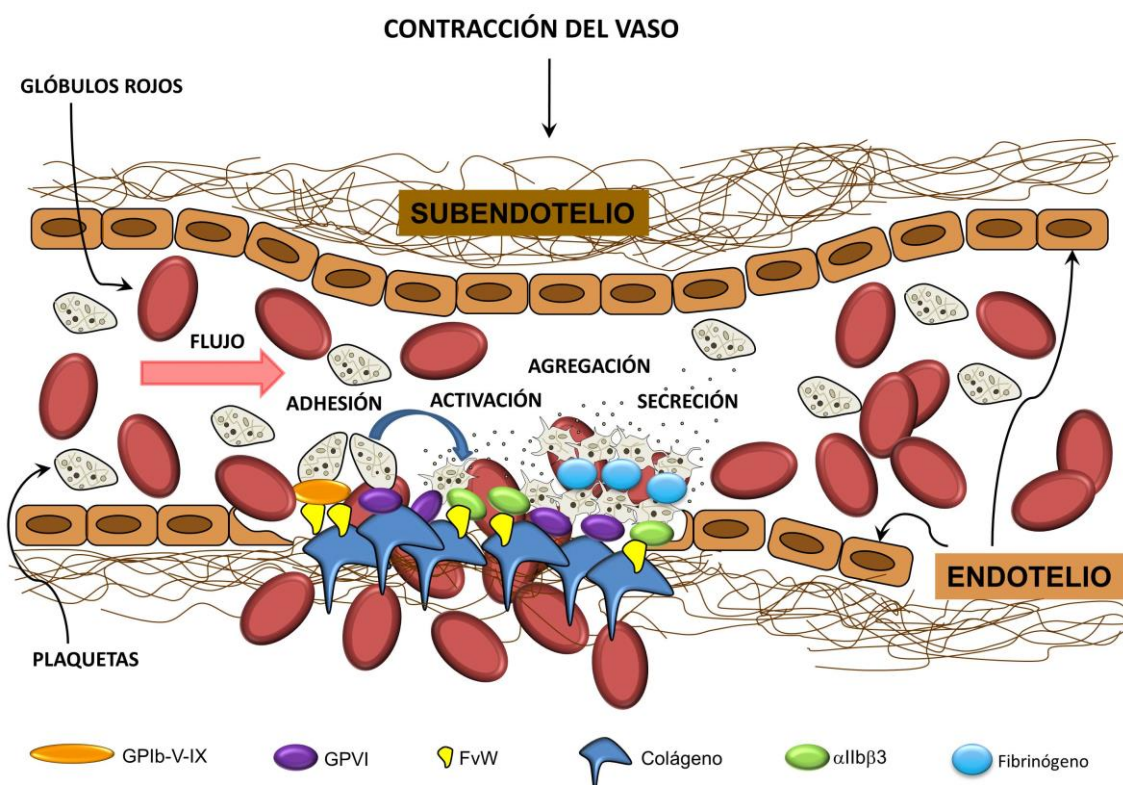


Figura 5: Representación de los principales procesos que ocurren en la hemostasia primaria: espasmo vascular reflejo, adhesión de las plaquetas circulantes al colágeno y al factor de von Willebrand (FvW) de la matriz subendotelial, activación plaquetaria, secreción de factores plaquetarios estimulantes (tromboxano A₂ y ADP, entre otros) y la agregación plaquetaria en la que participan moléculas de fibrinógeno (Fg) plasmático. Todos estos mecanismos permiten la formación de un tapón hemostático primario.

1.3.2 Hemostasia secundaria

La *hemostasia secundaria* se inicia a través de un proceso de activación proteolítica en cascada de cimógenos presentes en la sangre. Los cimógenos se activan consecutivamente unos a otros para dar lugar a proteínas con actividad enzimática. Durante este proceso

también se produce la conversión de procofactores en cofactores enzimáticos que aumentan la eficiencia catalítica y favorecen el contacto de los complejos enzimáticos con la superficie de la membrana rica en fosfolípidos. La cascada de la coagulación permite la generación de trombina que transforma el fibrinógeno en fibrina lo que conduce, tras varios pasos, a la formación de un coágulo estable.

Tras la lesión del vaso, la coagulación es iniciada *in vivo* por el FT que se expresa en condiciones basales en las células del subendotelio, a través de una vía denominada *vía extrínseca de la coagulación* haciendo alusión a la localización extravascular del FT. Sin embargo, existen otras fuentes de FT que pueden activar la coagulación en determinadas circunstancias. Por ejemplo, tanto los monocitos como las células endoteliales pueden exponer FT en la superficie celular en respuesta a estímulos de naturaleza pro-inflamatoria [237, 238]. Así mismo el FT puede hallarse asociado a micropartículas circulantes que provengan de células capaces de expresar FT [239]. Existen datos que indican que las micropartículas derivadas de los monocitos pueden interaccionar a través del ligando PSGL-1 con la CD62P de las plaquetas o las células endoteliales activadas promoviendo la activación de la coagulación por la vía extrínseca en sitios donde no se ha producido una pérdida de la continuidad de la pared vascular [183].

En una fase inicial de la coagulación o *fase de iniciación* (figura 6), el FT expuesto en la superficie celular se une al FVII activado (FVIIa) que en condiciones basales se encuentra en concentraciones muy bajas en el torrente sanguíneo. A continuación el complejo FVIIa-FT activa pequeñas cantidades de FX y FIX. El FX activado (FXa) obtenido activa pequeñas cantidades de FV que conjuntamente con el FV activado (FVa) liberado por las plaquetas activadas (cerca del 25% del FV proviene de plaquetas) permite la formación del complejo protrombinasa (FXa-FVa). Este complejo actúa sobre la protrombina (FII) para generar pequeñas cantidades de trombina (FIIa) (figura 6).

Durante este proceso, cualquier molécula de FXa que abandone la superficie celular en la que se ha formado, es inactivada rápidamente por el *inhibidor de la vía del FT* (TFPI, del inglés “Tissue Factor Pathway Inhibitor”) o por la AT-III evitando la extensión de la coagulación a otras áreas no afectadas. La cantidad de trombina que se genera mediante este mecanismo no

es suficiente para la formación de un coágulo estable por lo que la producción de trombina tiene que ser “amplificada”.

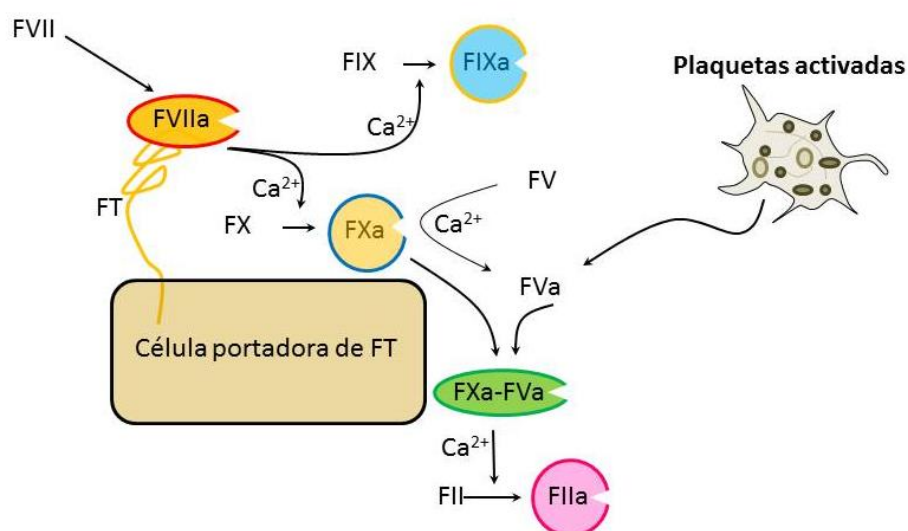


Figura 6: Fase de iniciación de la vía extrínseca de la coagulación.

Cuando la sangre entra en contacto con una superficie cargada negativamente (vidrio, caolín, sulfato de dextrano, etc) se produce la activación de la coagulación. A esta vía de activación se le denomina vía de activación por contacto o vía intrínseca de la coagulación. El sistema de activación por contacto se utiliza para el estudio *in vitro* de la cascada de la coagulación y constituye el mecanismo en el que se basa una de las pruebas de laboratorio más utilizadas en clínica, el tiempo de tromboplastina parcial activada. Sin embargo, en condiciones fisiológicas normales su contribución a los mecanismos hemostáticos no es significativa [240].

Los mecanismos que participan en la vía intrínseca de la coagulación se muestran de forma esquemática en la figura 7. El mecanismo de activación por contacto no es dependiente de calcio y en él participan dos zimógenos, el FXII y la precalicreina (PK), y un cofactor, el quiníngeno de alto peso molecular (HMWK). En el inicio de la activación por contacto, el FXII se une a una superficie cargada negativamente a través de dominios ricos en residuos de lisina con carga positiva [241, 242]. Esta unión causa un cambio conformacional en la molécula de FXII que conduce a una autoactivación del FXII [243, 244]. Este cambio conformacional también hace al FXII más susceptible a la acción proteolítica de la calicreina (K) [245]. El FXIIa

transforma a la PK unida a la superficie en un complejo con el HMWK para producir K [246]. La K a su vez activa nuevas moléculas de FXII en un proceso denominado *amplificación recíproca*. También el FXIIa puede activar nuevas moléculas de FXII (*autoamplificación*) [247, 248]. Por último el FXIIa activa al FXI que se encuentra unido a la superficie mediante un complejo formado con el HMWK. A partir de este paso, los mecanismos procoagulantes que participan en la obtención de trombina a través del FXIa no se conocen con exactitud. Se cree que en un paso posterior, el FXIa activa al FIX y el FIXa obtenido por esta vía activa al FX que produciría a su vez pequeñas cantidades de trombina que darían paso a la *fase de amplificación*. Sin embargo, existen datos que indican que el FIXa posee una actividad catalítica muy limitada en ausencia de su cofactor, el FVIIIa, por lo que es poco probable que pueda producir suficiente FXa que permita la generación de trombina necesaria para la obtención de un tiempo de tromboplastina parcial activada normal de entre 30-36 segundos [249, 250]. En contraste con lo anterior, existen datos recientes que indican que el FXIa es capaz de activar pequeñas cantidades de FVIII y FV [251] lo que permitiría la formación de cantidades suficientes de los complejos tenasa (FIXa-FVIIIa) y protrombinasa (FXa-FVa) facilitando la obtención de importantes cantidades de trombina que dieran paso a la *fase de amplificación*.

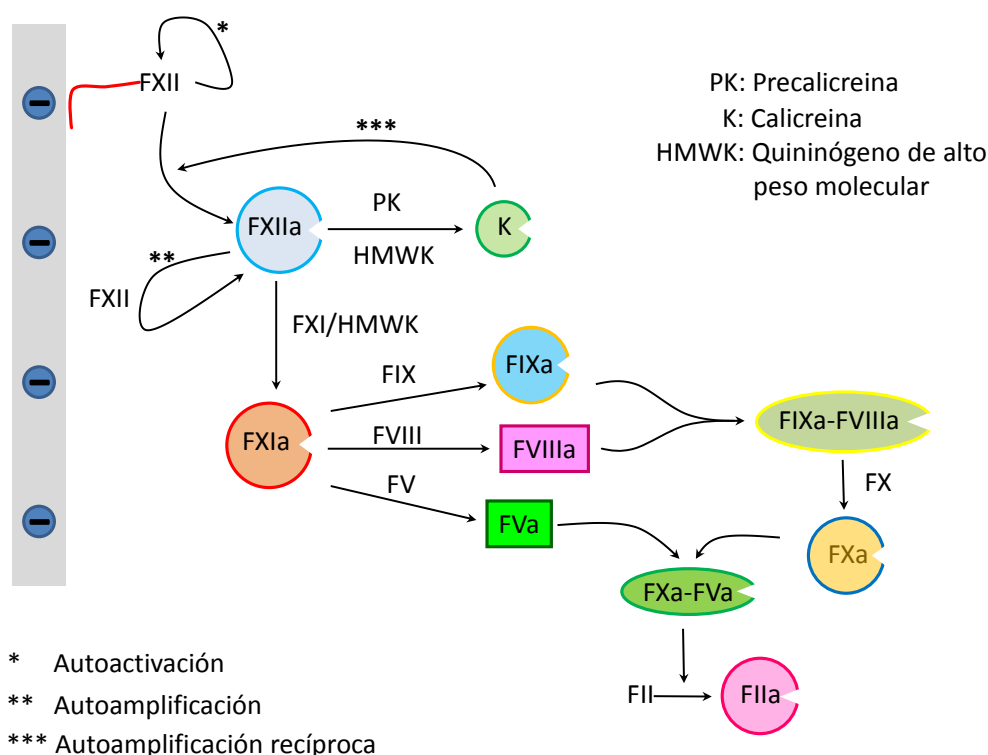


Figura 7: Representación esquemática de los mecanismos que participan en la vía de activación por contacto o vía intrínseca de la coagulación.

En la *fase de amplificación* (figura 8), las pequeñas cantidades de trombina generadas en la *fase de iniciación*, estimulan a nuevas plaquetas que llegan a través del torrente sanguíneo al sitio de la lesión y activa en la superficie de éstas, pequeñas cantidades de FV, FVIII y FXI. La activación del FVIII libera FvW del complejo FVIII-FvW que contribuye a la activación y reclutamiento de plaquetas a la zona afectada. Las plaquetas activadas ofrecen en el sitio de la lesión una superficie procoagulante que permitirá la generación de altas concentraciones de trombina, imprescindibles para la formación de un tapón hemostático estable durante la *fase de propagación*.

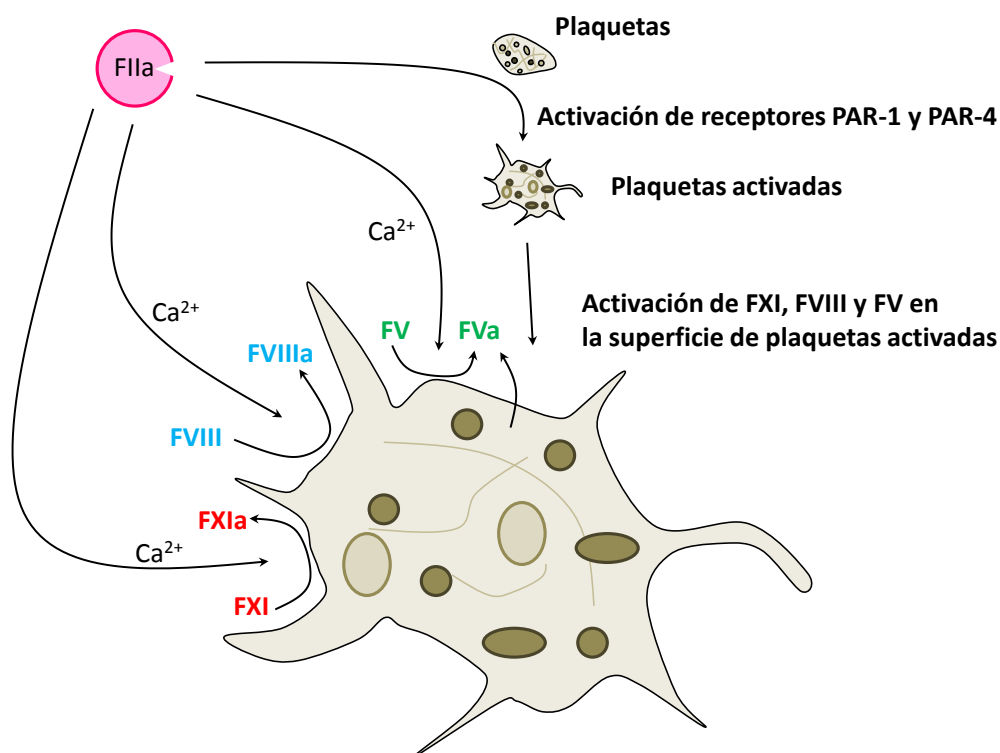


Figura 8: Fase de amplificación.

En la *fase de propagación*, se establece un sistema de retroalimentación positiva que conduce a la obtención de concentraciones elevadas de trombina (explosión de trombina). En un inicio, las incipientes cantidades de FIXa y FVIIIa originadas en las fases anteriores se asocian en la superficie de las plaquetas activadas con la participación de iones de Ca^{2+} para dar lugar al complejo *tenasa* (FIXa-FVIIIa) que genera concentraciones altas de FXa. El FXa originado se une a su vez al FVa en la superficie de plaquetas activadas, también con la

participación de iones de Ca^{2+} , para formar el complejo protrombinasa (FXa-FVa) que dará lugar a más moléculas de trombina. La trombina a su vez actúa sobre nuevas moléculas de FX, FV, FIX y FVIII para generar en la superficie plaquetaria más FXa, FVa, FIXa, FVIIIa cerrando el mecanismo de retroalimentación positiva (figura 9).

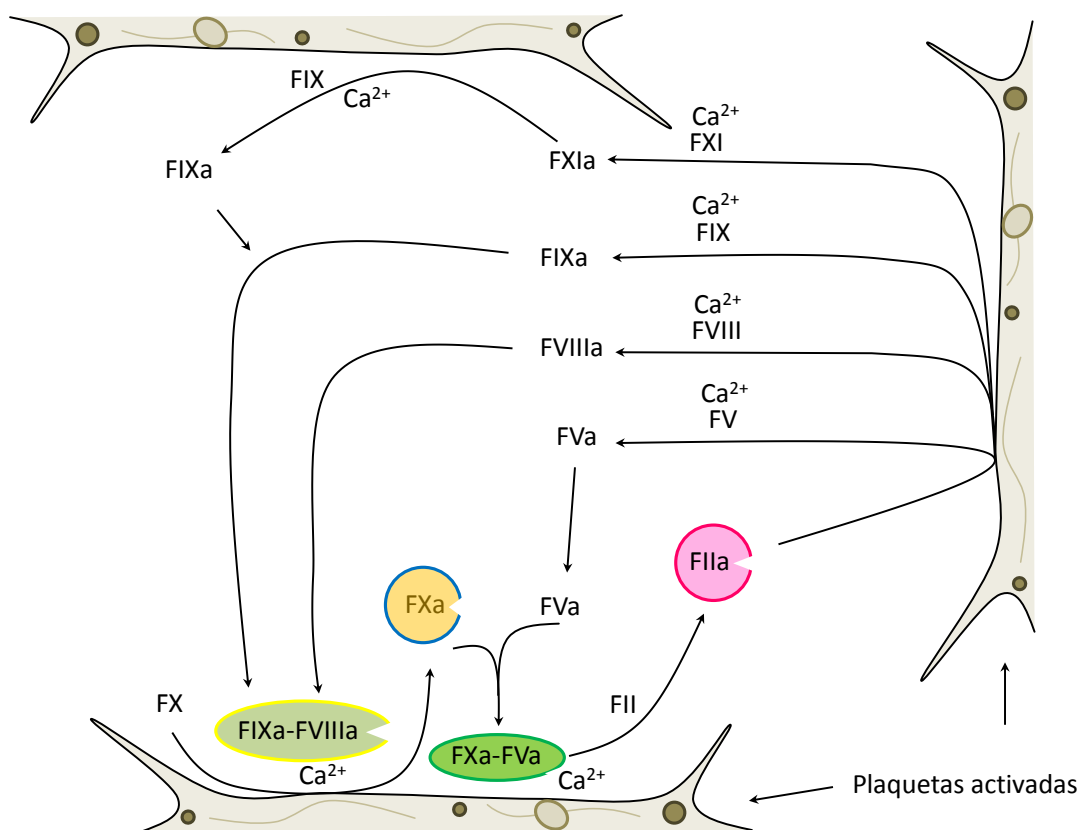


Figura 9: Fase de propagación

La trombina generada, el fibrinógeno y el FXIII son las moléculas principales de la etapa final de la coagulación [229]. En un primer paso hacia la formación de una malla insoluble de fibrina, la trombina actúa sobre el fibrinógeno mediante proteólisis parcial liberando al fibrinopéptido A y al fibrinopéptido B. Esto conduce a la generación de moléculas de fibrina que polimerizan espontáneamente mediante enlaces no covalentes. En este punto, es interesante destacar que la trombina tiene un sitio de unión a la fibrina y su unión a ella le protege de sus inhibidores naturales a la vez que conserva su actividad catalítica. Esto contribuye a mantener un potencial procoagulante en las zonas adyacentes a las fibras de fibrina en formación favoreciendo el fortalecimiento del coágulo.

Debido a que la polimerización espontánea de la fibrina se produce mediante enlaces no covalentes, es necesaria la estabilización de la estructura. Esto se logra a través de la participación del FXIII cuya función catalítica es activada por la trombina [252]. El FXIIIa produce un entrecruzamiento entre las diferentes fibras poliméricas de fibrina mediante enlaces covalentes lo que permite la obtención de una malla estable de fibrina [253]. La retracción del coágulo producida gracias a la participación del sistema contráctil de la plaqueta y a la interacción entre la $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ presente en la superficie plaquetaria y los polímeros de fibrina, contribuye a la impermeabilización del coágulo lo que aumenta su resistencia al flujo sanguíneo.

1.3.3 Fibrinólisis

La fibrinólisis es el mecanismo mediante el cual se produce la lisis del coágulo. Los principales componentes del sistema fibrinolítico son el plasminógeno y su forma activa: la plasmina; los activadores del plasminógeno: el activador tisular del plasminógeno (tPA) y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA); los inhibidores de los activadores del plasminógeno: PAI-1 y PAI-2 (inhibidores tipo 1 y 2 del activador del plasminógeno); y la α_2 -antiplasmina. En la región aminoterminal del plasminógeno existen regiones de unión a residuos de lisina de la región carboxiterminal de la fibrina. El tPA también posee estas regiones de unión a la fibrina lo que facilita la formación del complejo ternario *plasminógeno-fibrina-tPA* que es imprescindible para la actividad proteolítica del tPA sobre el plasminógeno para la formación de plasmina.

La plasmina rompe los enlaces de los dímeros de fibrina produciendo los fragmentos conocidos como dímeros-D. También actúa sobre el fibrinógeno originando los productos de degradación del fibrinógeno que interfieren en la polimerización de la fibrina y se une a la plaqueta provocando alteraciones en su función. La plasmina también degrada a los FVa, FVIIIa, FIXa y FXIa.

1.3.4 Regulación de la hemostasia

La hemostasia está regulada mediante numerosos mecanismos. En condiciones normales, la superficie del endotelio es anticoagulante mediante varios mecanismos. La ADP-asa, la prostaciclina y el factor de relajación endotelial (óxido nítrico) inhiben la activación plaquetaria; la trombomodulina, el cofactor II de la heparina, la proteína C y la AT-III ancladas a la pared endotelial inhiben la hemostasia secundaria y el tPA liberado por el endotelio limita la formación de la malla de fibrina.

Las moléculas de trombina que escapan del área lesionada se unen a la trombomodulina anclada en la superficie del endotelio. El complejo trombina-trombomodulina activa a la proteína C que unida a su cofactor, la proteína S, forman un potente complejo que inactiva rápidamente a los cofactores FVIIIa y FVa impidiendo la formación de nuevos complejos tenasa y protrombinasa. Por otro lado, la AT-III asociada a proteoglicanos anclados en la pared endotelial inhibe a la trombina y a otras proteasas de la coagulación tales como el FIXa, FXa, FXIa y FXIIa.

El activador tisular del plasminógeno (tPA) limita el crecimiento del trombo mediante la activación de la fibrinólisis. Paralelamente, pero en dirección contraria, la trombina inhibe la fibrinólisis mediante la activación del *inhibidor de la fibrinólisis activado por la trombina* (TAFI). El TAFI activado libera residuos de arginina y lisina del extremo carboxiterminal de la fibrina interfiriendo en el mecanismo de activación de la plasmina e inhibiendo como consecuencia la lisis del coágulo [254].

1.3.5 Relación entre la coagulación y la inflamación

Existen datos que indican una interacción entre la coagulación y la inflamación de tal forma que un proceso inflamatorio puede activar la coagulación y viceversa.

El FT juega un papel crucial en la activación de la coagulación en respuesta al desarrollo de un proceso inflamatorio. Por ejemplo, la activación de la coagulación en respuesta a endotoxemia o a bacteriemia *in vitro* puede ser inhibida mediante la utilización de anticuerpos contra el FT [255, 256]. Asimismo, en individuos con ciertos niveles de endotoxemia se observa

un incremento de hasta 125 veces en la expresión de FT en los monocitos circulantes [257]. El aumento de la síntesis de FT en respuesta a la endotoxemia parece estar mediada por la IL-6, una de las principales interleuquinas inflamatorias [258].

La activación de la coagulación puede contribuir al desarrollo de los procesos inflamatorios a través de la activación de los *receptores activados por proteasas* (PAR). Algunos cimógenos activados durante la coagulación son capaces de activar a los receptores PAR situados en la superficie de las células endoteliales, los leucocitos, fibroblastos, las plaquetas y células del músculo liso [259]. Los receptores PAR-1 y PAR-4 pueden ser activados por la trombina mientras que el receptor PAR-2 puede ser activado por el complejo FVIIa-FT y el FXa (también un potente activador de receptores PAR-1) [260-262]. La activación de receptores PAR-1 en la superficie del endotelio produce la contracción de las células endoteliales facilitando el paso de las células inflamatorias y el desarrollo de la reacción inflamatoria. También estimula la secreción de IL-6 [263] e IL-8 [264] por las células endoteliales así como la exposición de CD62E [264] y de FT [265] en la superficie de estas células. En los macrófagos, la activación de los receptores PAR-1 aumenta la secreción de elastasa [266] y en los monocitos incrementa la liberación de IL-1 e IL-6 [267]. La unión del complejo FVIIa-FT al receptor PAR-2 de la superficie de los macrófagos y los neutrófilos puede estimular a estas células promoviendo el desarrollo de la respuesta inflamatoria [268] (figura 10).

Las plaquetas intervienen activamente en los mecanismos inflamatorios. Una vez activadas expresan P-selectina que interacciona con el PSGL-1 de la superficie de los leucocitos facilitando su adhesión y migración hacia la zona afectada [269]. También secretan varias moléculas pro-inflamatorias como el sCD40L, RANTES y el factor 4 plaquetario que activan la expresión de integrinas en los monocitos contribuyendo a su activación y reclutamiento [270].

La inflamación produce alteraciones en varios sistemas anticoagulantes como el de la AT-III y la proteína C. En la inflamación severa se observa una disminución en los niveles de AT-III debido a su consumo, la disminución de su síntesis [271] y su degradación por la elastasa de los neutrófilos activados [272]. La AT-III reduce la expresión de los receptores de citocinas proinflamatorias en neutrófilos y leucocitos [273] por lo que su disminución podría contribuir al establecimiento de un entorno pro-inflamatorio.

Durante la inflamación disminuyen los niveles de la proteína C debido a una disminución en su síntesis [271] y a un aumento en su degradación por la elastasa de los neutrófilos activados [274]. Indirectamente, la disminución de la síntesis de la trombomodulina mediada por el aumento en los niveles del TNF- α y de la IL-1 β [275] durante la inflamación también contribuye a la disminución en los niveles de proteína C activa.

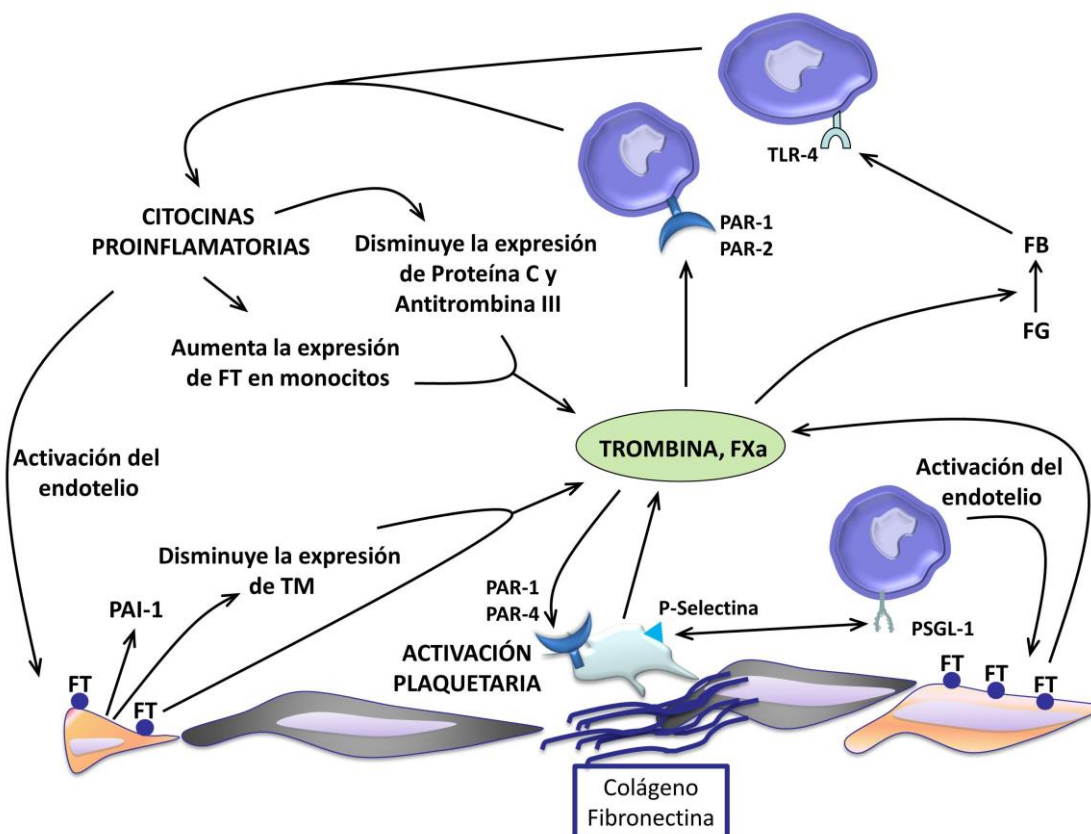


Figura 10: Relación entre inflamación y coagulación. La exposición de proteínas adhesivas de la matriz subendotelial estimula la adhesión y activación plaquetaria. Las plaquetas activadas exponen P-selectina que facilita el reclutamiento de linfocitos y monocitos al área afectada y ofrecen una superficie procoagulante para la generación de FXa y trombina. El FXa y la trombina activan receptores PAR en la superficie de monocitos estimulando la liberación de mediadores proinflamatorios que modulan la producción de trombina y la fibrinólisis. La fibrina activa receptores *TLR-4* en la superficie de monocitos contribuyendo al efecto proinflamatorio de la trombina. FG: fibrinógeno, FB: fibrina, FT: factor tisular, PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1, PSGL-1: ligando glicoproteico-1 de la P-selectina.

La actividad anti-inflamatoria de la proteína C ha sido extensamente confirmada tanto *in vitro* como *in vivo*. La proteína C ha demostrado limitar la reacción inflamatoria en varios modelos de inflamación severa [276-278] y se ha comprobado que es capaz de disminuir la mortalidad de pacientes con sepsis grave [279]. Estos datos indican que la disminución de los

niveles de la proteína C podría contribuir no sólo a la producción de un estado protrombótico sino también a un estado pro-inflamatorio.

La trombomodulina permite, gracias a su unión con la trombina, la activación del TAFI. El TAFIa ejerce una actividad anti-inflamatoria mediante la degradación de las anafilotoxinas C3a y C5a limitando su efecto pro-inflamatorio y la actividad lítica del complemento [280, 281]. La formación del complejo trombina-trombomodulina permite también la activación de la proteína C, que como dijimos anteriormente posee un potente efecto anti-inflamatorio, y limita la actividad pro-inflamatoria de la trombina inhibiendo su actividad proteolítica sobre los receptores PAR. La trombomodulina ejerce también un efecto anti-inflamatorio directo a través de la inhibición de la adhesión de leucocitos al endotelio activado [282].

Durante la inflamación las células endoteliales liberan tPA y uPA en respuesta a la presencia de fibrina y como consecuencia del efecto de numerosas citocinas pro-inflamatorias [283-285]. Sin embargo también liberan una cantidad considerable y sostenida de PAI-1 [286] en respuesta al aumento de los niveles de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β [287]. El efecto neto es la disminución de la fibrinólisis y el establecimiento de un estado protrombótico que podría facilitar la formación de microtrombos en el árbol vascular. El entorno pro-inflamatorio estimula la expresión en las células endoteliales de CD62P y de CD62E, elementos de adhesión leucocitaria que facilitan la migración de leucocitos hacia la zona afectada contribuyendo a la inflamación y al daño endotelial.

1.3.6 Técnicas para la evaluación global de la hemostasia

- Tromboelastometría Rotacional (ROTEM®)

La Tromboelastometría Rotacional (ROTEM®) es un método de laboratorio que permite el estudio cinético de la formación del coágulo. El ensayo se realiza con sangre completa anticoagulada con citrato de sodio y analiza el cambio en las propiedades viscoelásticas de la sangre a medida que se produce la formación del coágulo.

El test permite evaluar en una forma global la coagulación del paciente ya que no determina los niveles de una molécula en concreto sino que evalúa el producto de la

interacción entre todos los factores de la coagulación, sus inhibidores y el componente celular (plaquetas, eritrocitos, leucocitos, etc). Por otro lado, el ROTEM® es una técnica muy versátil lo que la hace útil en la evaluación del efecto de fármacos con actividad pro- y anti-coagulante.

En este método, la sangre y los reactivos se disponen en una cubeta de plástico que se acopla a una pieza metálica alargada o perno que rota sobre su eje. A medida que transcurre el test, el dispositivo registra la resistencia a la rotación que se produce como consecuencia de la formación del coágulo (figura 11). En la figura 12 se representa la gráfica característica (tromboelastograma) que se obtiene mediante este método.



Figura 11: Representación de las partes fundamentales del Tromboelastómetro y el mecanismo de funcionamiento. La sangre y los reactivos son colocados en una cubeta de plástico formada por dos partes que se acoplan entre sí. Una parte de la cubeta queda fija dentro de un soporte termostatzado y la otra se acopla a un perno oscilante. Una vez acoplados, entre el perno y la cubeta se crea un espacio de 1 mm donde se aloja la sangre y los reactivos. A medida que comienza el proceso de coagulación, el movimiento del perno disminuye y la resistencia mecánica se convierte en los diferentes parámetros que caracterizan la cinética de la formación y la lisis del coágulo. Adaptado a partir de <http://www.rottem.de/en/methodology/>.



Figura 12: Representación de un tromboelastograma con los parámetros más utilizados.

Los parámetros que más se utilizan para caracterizar la formación del coágulo son el tiempo de coagulación (CT) (medido en segundos) definido como el tiempo que transcurre entre el comienzo del test y el inicio de la formación del coágulo (2 mm de amplitud en el eje “y” del gráfico); el tiempo de formación del coágulo (CFT) (en segundos), definido por el tiempo que transcurre desde el CT hasta la obtención de una amplitud de 20 mm; el ángulo α (en grados) que se calcula a partir de la tangente a la curva cuando la amplitud es de 2 mm; y la fortaleza máxima del coágulo (MCF) (en mm) definida por la amplitud máxima obtenida.

El CT depende fundamentalmente de los niveles de los factores de la coagulación y sus inhibidores, por lo que una alteración en este parámetro indicaría la existencia de cantidades anormales de factores de la coagulación, de sus inhibidores o la presencia de algún contaminante en la muestra (por ejemplo: heparina).

Tanto el CFT como el ángulo α describen la velocidad de formación del coágulo. Estos parámetros, al igual que el MCF, son sensibles en gran medida a alteraciones en la polimerización de fibrina o en la fibrinólisis, a la presencia de trombocitopenia o a alteraciones en la función plaquetaria. Un ejemplo de ello es el gráfico que aparece en la figura 13 donde se representan las curvas obtenidas en nuestro laboratorio al analizar la sangre de un paciente

diagnosticado de Púrpura Trombocitopénica Idiopática con diferentes recuentos de plaquetas/ μl . En este paciente se obtuvo un valor de CT normal y similar en las diferentes mediciones mientras que los valores de MCF y el ángulo α estaban significativamente disminuidos y el valor del CFT estaba aumentado.

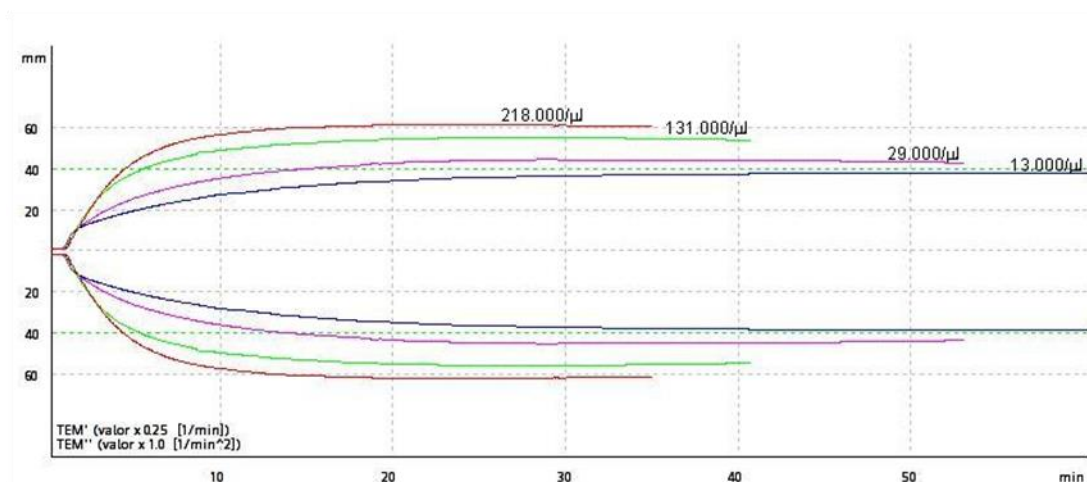


Figura 13: Tromboelastogramas obtenidos en un paciente con púrpura trombocitopénica idiopática en diferentes días. El recuento de plaquetas (plaquetas/ μl) aparece encima de cada curva.

Existen diferentes pruebas para evaluar la hemostasia mediante el ROTEM®:

Test INTEM: Evalúa principalmente la vía intrínseca de la coagulación. En este test, el activador de la coagulación es una solución que contiene ácido elágico y fosfolípidos (tromboplastina parcial de cerebro de conejo). El ácido elágico es un polifenol que al pH del test se encuentra cargado negativamente, lo que produce una activación moderada y controlada de la fase de contacto. Este test es sensible a variaciones en los niveles de los factores de la coagulación, a alteraciones en la función plaquetaria y a la polimerización de la fibrina, así como a defectos en los mecanismos de la fibrinólisis. El test también es sensible a la presencia de anticoagulantes tales como heparina, Hirudina, Argatrovan y otros inhibidores de la trombina.

Test EXTEM: En este caso, la solución activadora de la coagulación contiene FT recombinante por lo que el ensayo evalúa principalmente la vía extrínseca de la coagulación. Por ello el test no es insensible a deficiencias en los niveles de FVIII, FIX y FXI. Al igual que el test INTEM, este test permite evaluar la vía común de la cascada de la coagulación y se afecta por alteraciones en los niveles de fibrinógeno y la polimerización de fibrina, defectos en la

función plaquetaria y disminución en el recuento de plaquetas. También permite detectar con mayor facilidad la presencia de un estado hiperfibrinolítico.

Test FIBTEM: Se realiza una activación de la vía extrínseca de la coagulación en presencia de Citocalasina D, un potente inhibidor de los elementos contráctiles de la plaqueta por lo que los resultados del test dependen fundamentalmente de los niveles de fibrinógeno y de los factores de la coagulación.

- Trombinografía Automática Calibrada (CAT)

Las siglas “CAT” son el acrónimo en inglés de “**Calibrated Automated Thrombogram**”, que en español podríamos traducir como “Trombinografía Automática Calibrada”. El CAT es un método fluorimétrico desarrollado por Hemker *et al.* [234, 288-290] que cuantifica la cantidad de trombina que se genera en una muestra de plasma después de la activación de la coagulación.

En este ensayo se añade al plasma un sustrato fluorogénico específico de la trombina que al ser escindido por ella libera un producto fluorescente. El desarrollo de la fluorescencia en función del tiempo permitirá conocer la cinética de la generación de trombina.

Por lo general, la activación de la coagulación se realiza con FT y una mezcla de fosfolípidos si la muestra es plasma pobre en plaquetas (PPP) o con FT sin fosfolípidos en el caso de utilizar plasma rico en plaquetas (PRP). La medición se realiza en un fluorímetro de placa de 96 pocillos equipado con un filtro de excitación/emisión (390/640) a una temperatura de 37°C. El equipo cuenta con un programa específico que permite su manejo y el cálculo automático de la generación de trombina.

Una de las ventajas más importantes del método fluorimétrico es que no se afecta por la turbidez de la muestra. Sin embargo, el test se puede afectar por numerosos factores tales como el efecto del filtro interno (absorción y emisión de fluorescencia por las propias moléculas que la emiten), el tiempo de uso de la lámpara emisora de la radiación excitante y la capacidad fluorogénica individual del plasma del paciente. También durante el transcurso de la determinación, un 30-40% del sustrato fluorogénico es consumido lo que afecta el cálculo

de la concentración de trombina. Para corregir estos factores que pueden afectar la determinación de la producción de trombina el método incluye la medición en paralelo de la generación de trombina en pocillos que contienen la muestra problema y una concentración conocida del complejo alfa2-macroglobulina/trombina. Este complejo puede escindir el sustrato fluorogénico pero no es capaz de actuar sobre ninguno de los sustratos de la trombina.

En la figura 14 se muestra a modo de ejemplo un trombograma y los parámetros que se obtienen en el test. El *tiempo de latencia* (TL) es el tiempo requerido para la formación de 10 nM de trombina. El *tiempo al pico* (TAP) es el tiempo requerido para alcanzar la máxima concentración de trombina o la *altura del pico* (AP). El *potencial endógeno de trombina* (ETP) representa la capacidad máxima de generación de trombina de la muestra y es equivalente al área bajo la curva de la concentración de trombina vs. el tiempo. Todos los parámetros son calculados de forma automática por el programa Thrombinoscope de Thrombinoscope BV (Maastricht, Holanda). El Índice de Velocidad (IV), permite calcular la velocidad con la que se genera la trombina durante el ensayo. Se puede obtener a partir de los datos experimentales mediante la siguiente fórmula:

$$IV = \frac{AP}{TAP - LT}$$

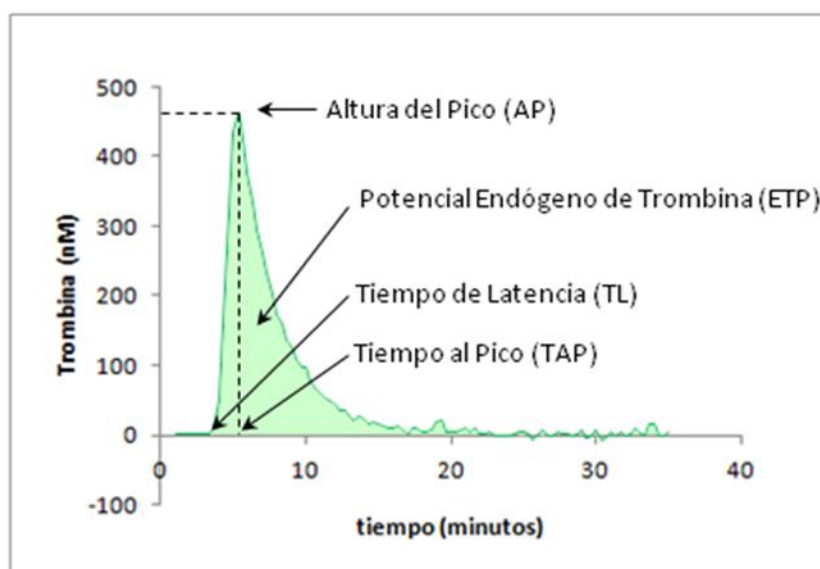


Figura 14: Ejemplo de gráfico que se obtiene en la Trombinografía Automatizada Calibrada (CAT). Se representa el *tiempo de latencia* (TL) (minutos) definido por el tiempo que transcurre desde el comienzo del test hasta el momento de la generación de 10 nM de trombina; la *altura del pico* (AP) (nM) definido por la máxima concentración de trombina alcanzada; el *tiempo al pico* (TAP) (minutos) o tiempo que transcurre desde el inicio del test hasta la obtención de la concentración máxima de trombina; y el *potencial endógeno de trombina* (ETP) (nM x minutos) (zona coloreada en verde) que representa la cantidad total de trombina generada durante el transcurso del test.

2. Hipótesis

- 2.1 La EB se caracteriza por la presencia de un estado protrombótico. El estudio del estado protrombótico de los pacientes con EB utilizando los test globales de la coagulación (ROTEM® y CAT) podría aportar nuevos datos sobre los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad y ser útiles en el seguimiento de su evolución.
- 2.2 En los pacientes con EB se observa una alteración funcional del endotelio (activación y/o daño endotelial) que puede contribuir al desarrollo del estado inflamatorio y protrombótico de la enfermedad. El estudio de los niveles de sCD62E, marcador específico de la activación y/o daño endotelial, podría aportar nuevos datos sobre las causas de la enfermedad y ser un marcador de su evolución.
- 2.3 Las plaquetas son la fuente principal de sCD40L de la sangre y participan en la activación y el reclutamiento de células inflamatorias hacia el endotelio lesionado por lo que pueden estar involucradas en el desarrollo de los mecanismos proinflamatorios y protrombóticos asociados a la EB.

3. Objetivos

- 3.1 Caracterizar el estado protrombótico de los pacientes con EB mediante tromboelastografía rotacional (ROTEM®) y el test de generación de trombina (CAT).
- 3.2 Estudiar la relación entre la capacidad procoagulante del paciente (evaluada mediante ROTEM® y CAT), la actividad de la enfermedad, los niveles plasmáticos de fibrinógeno, PAI-1, tPA, complejo trombina-antitrombina III, proteína C reactiva, dímero-d, sCD62E y recuento de plaquetas y de eritrocitos.
- 3.3 Estudiar la función plaquetaria en pacientes con EB y su relación con el estado inflamatorio de la enfermedad mediante la determinación de la exposición plaquetaria de CD40L, de P-selectina, la activación del receptor de fibrinógeno y la identificación y cuantificación de agregados de plaquetas-linfocitos.
- 3.4 Estudiar si el CD40L y la MMP-9 plaquetarias contribuyen al estado inflamatorio en la EB y evaluar si existe una relación funcional entre ambos utilizando un modelo celular *in vitro* con células MEG-01.

4. Materiales y Métodos

4.1 Sujetos del estudio.

Se incluyeron 33 pacientes diagnosticados de EB en la Unidad de Reumatología del Hospital Universitario Gregorio Marañón. El grupo control estuvo formado por 33 sujetos sanos, donantes de sangre de la Unidad de Donantes de Sangre del Hospital Universitario La Paz. El Comité Ético del Hospital Universitario La Paz aprobó el protocolo y los sujetos fueron incluidos en el estudio después de la obtención del Consentimiento Informado. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki.

El diagnóstico de la EB se realizó siguiendo los criterios del “Grupo de Estudio Internacional para la Enfermedad de Behçet” [6] y su versión actualizada [291]. La actividad de la enfermedad fue determinada según las guías de Bhakta *et al.* [292].

4.2 Criterios para la inclusión y exclusión de sujetos en el estudio

Criterios de inclusión

Pacientes:

- Pacientes diagnosticados de EB.
- Pacientes mayores de 18 años.
- Pacientes que hayan aceptado participar en el estudio mediante la firma del Consentimiento Informado.

Controles sanos:

- Sujetos mayores de 18 años.
- Sujetos que hayan aceptado participar en el estudio mediante la firma del Consentimiento Informado.

Criterios de exclusión (Pacientes y Controles sanos):

- Tratamiento con anticoagulantes o medicamentos que puedan afectar la hemostasia tales como antagonistas de la vitamina K, heparinas, antiinflamatorios no esteroideos, anticonceptivos orales, agentes antiplaquetarios y antidepresivos del tipo de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.

- Fumadores en los 12 meses previos al estudio.
- Hipertensión o hiperlipemia no controladas.
- Diabetes.
- Enfermedad arterial coronaria o periférica.
- Función renal o hepática alterada.
- Anticuerpos antifosfolípidos (anticuerpos anticardiolipinas, anti-beta2-glicoproteína I y/o anticoagulante lúpico).
- Presencia o sospecha de presencia de cualquier enfermedad de naturaleza inflamatoria u otra condición clínica que pudiera afectar la consecución de los objetivos del estudio.

4.3 Extracción y preparación de las muestras

Para evitar la influencia de los ciclos circadianos en las variables estudiadas, la hora de extracción fue la misma para todos los sujetos del estudio (entre las 9 y las 10 horas de la mañana).

Para la realización del recuento de células las muestras de sangre se recogieron en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), para el resto de los ensayos se extrajo la sangre en tubos con citrato sódico (3,8%) (ambos tipos de tubos de Becton, Dickinson and Company, Madrid, España).

El PRP fue obtenido mediante la centrifugación de sangre completa a 150 x g, durante 20 minutos a 23°C.

Para la obtención de plaquetas lavadas, los dos primeros tercios del PRP fueron centrifugados a 650 x g, durante 10 minutos a 23°C después de la adición de una solución de ácido cítrico-dextrosa (85 mM citrato de sodio, 65 mM ácido cítrico y 104 mM glucosa) en una proporción 1:10. A continuación el sedimento fue resuspendido en un volumen igual de solución tampón HEPES (10 mM HEPES, 145 mM NaCl, 5 mM KCl y 1 mM MgSO₄; pH 7,4).

El PPP se obtuvo mediante centrifugación de la sangre completa a 2.500 x g, durante 20 minutos a 23°C.

4.4 Técnicas para la evaluación global de la hemostasia

4.4.1 Tromboelastometría Rotacional (ROTEM®)

El ROTEM® se realizó en sangre completa citratada que se mantuvo en reposo un mínimo de 30 minutos y un máximo de 1 hora previo a las determinaciones.

La cinética de la formación del coágulo se evaluó con el test “INTEM” y los parámetros derivados de este test fueron: INTEM-CFT, INTEM- α e INTEM-MCF. Para la realización del test se adicionaron a la cubeta de reacción: 300 μ l de sangre completa citratada, 20 μ l de un activador de la vía intrínseca de la coagulación (reactivo in-tem®) y 20 μ l de una solución de CaCl_2 (0,2 M, reactivo star-tem®) para revertir el efecto anticoagulante del citrato de sodio.

Para el estudio de la contribución de las plaquetas (CP) a la fortaleza máxima del coágulo [CP (MCF)] se utilizó un test FIBTEM modificado. Para la realización de este test se adicionó a la cubeta de reacción: 300 μ l de sangre citratada, 20 μ l del reactivo in-tem® y 20 μ l del reactivo fib-tem®. La CP (MCF) se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$CP (MCF) = \left[1 - \frac{FIBTEM (MCF)}{INTEM (MCF)} \right] \times 100$$

Cada determinación se prolongó el tiempo necesario hasta la obtención de la fortaleza máxima del coágulo (MCF).

4.4.2 Trombinografía Automática Calibrada (CAT)

El CAT se realizó en PPP. Las muestras se descongelaron a 37°C durante 10 minutos. A continuación se dispensaron en cada pocillo 80 μ l de muestra, 20 μ l del reactivo “PPP-Reagent LOW” (Thrombinoscope BV, Maastricht, Holanda), compuesto por FT recombinante (concentración final= 1 pM) y una mezcla de fosfolípidos (concentración final de fosfolípidos totales= 4 μ M), y 20 μ l de una solución tampón compuesta por un sustrato específico de la trombina y CaCl_2 (solución FluCa Kit de Thrombinoscope BV, Maastricht, Holanda). El *tiempo de latencia* (TL), el *tiempo al pico* (TAP), la *altura del pico* (AP) y el *potencial endógeno de*

trombina (ETP) se calcularon de forma automática con el programa Thrombinoscope (Thrombinoscope BV, Maastricht, Holanda). El Índice de Velocidad (IV), se calculó a partir de los datos experimentales mediante la siguiente fórmula:

$$IV = \frac{AP}{(TAP - TL)}$$

4.5 Determinación de marcadores plasmáticos relacionados con la inflamación, la hemostasia y el daño o activación endotelial

Para el estudio de la fibrinólisis se determinaron los niveles de tPA y PAI-1 mediante el kit “TriniLIZE tPA antigen ELISA” y el kit “TriniLIZE PAI-1 antigen ELISA” respectivamente, ambos de Trinity Biotech, Bray, Co Wicklow, Irlanda.

Los niveles de dímero-D y fibrinógeno se determinaron en PPP mediante el sistema BCS[®] XP de Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburgo, Alemania.

Los niveles antigénicos de TAT se determinaron en PPP mediante test ELISA con el kit “AssayMax Human Thrombin-antithrombin Complexes ELISA Kit” de ASSAYPRO (San Carlos, Misuri, Estados Unidos de América).

Los niveles de la proteína-C reactiva se determinaron por nefelometría usando un nefelómetro BNII de Dade Behring (Madrid, España).

Los niveles de sCD62E se determinaron con el kit “Human sE-Selectin/CD26E Immunoassay Quantikine[®] ELISA kit (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, Reino Unido).

Todas las determinaciones aquí mencionadas se realizaron en el PPP de sangre recogida en citrato.

4.6 Determinación del estado de activación de las plaquetas

Para determinar el estado de activación plaquetario se utilizó el PRP. El estado de activación de las plaquetas se estudió en el estado basal y después de un estímulo con agonistas. En primer lugar, el PRP se diluyó 1:10 con tampón Tyrode modificado (5 mM HEPES; 2 mM MgCl_2 ; 0,3 mM NaH_2PO_4 ; 3 mM KCl; 134 mM NaCl; 12 mM NaHCO_3 ; 0,1% glucosa; 0,1% albúmina bovina y 1 mM CaCl_2 ; pH 7,4). A continuación, las plaquetas se incubaron a temperatura ambiente con TRAP 100 μM (Péptido Activador del Receptor de Trombina, SFLRN, Bachem, Bubendorf, Suiza) o con ADP 20 μM (Sigma, Madrid, España) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se añadió PAC1 (Becton Dickinson, Madrid, España), un anticuerpo monoclonal (mAb) que reconoce sólo la forma activa del receptor de fibrinógeno, o un mAb contra la P-selectina humana (BD Pharmingen, Madrid, España), ambos marcados con fluoresceína (FITC). Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, las plaquetas se diluyeron con tampón Tyrode modificado y se realizó el análisis por citometría de flujo (Becton Dickinson FACScan benchtop flow cytometer, Becton Dickinson).

4.7 Estudio de la agregación plaquetaria

La agregación plaquetaria se estudió en PRP mediante un lumiagregómetro (Chrono-log Corporation, Havertown, PA, Estados Unidos de América). El PRP se preincubó durante 2 minutos a 37°C antes de la adición de ADP (40 μM) o de TRAP (30 μM) para inducir la agregación plaquetaria. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la agregación máxima (%). Inmediatamente después de la formación del coágulo, el contenido de las cubetas fue centrifugado para la obtención de los sobrenadantes que se almacenaron a -80°C hasta la determinación de los niveles antigénicos de MMP-9 y de sCD40L por ELISA aplicando los métodos descritos anteriormente.

4.8 Determinación de los agregados de plaquetas y leucocitos

Para el análisis de la formación de agregados de plaquetas y leucocitos, se adicionó 5 μl de sangre a 45 μl de una solución tampón de HEPES salino (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 10 mM HEPES; pH 7,4) con anticuerpos contra el antígeno de diferenciación

plaquetario de superficie CD41 (marcado con ficoeritrina, Biocytex, Marsella, France) y el antígeno de diferenciación pan-leucocitario CD45 (marcado con FITC, Becton Dickinson, Madrid, España).

En los experimentos de activación plaquetaria se adicionó TRAP (50 μ M) o ADP (40 μ M) durante la incubación con los anticuerpos. Las muestras fueron incubadas a continuación durante 20 minutos en presencia o ausencia de 10 μ g/ml de un anticuerpo neutralizante contra el CD40 humano (clon 82102, R&D Systems, Mineápolis, Estados Unidos de América) y contra el CD40L (clon 40804, R&D Systems, Mineápolis, Estados Unidos de América), o contra la P-selectina humana (clon 9E1, R&D Systems, Mineápolis, Estados Unidos de América). La señal de inmunofluorescencia inespecífica de las membranas celulares y el fondo, se determinaron utilizando IgG inespecíficas. Para finalizar, las muestras se diluyeron con PBS y se analizaron en un citómetro de flujo (Becton Dickinson FACScan benchtop flow cytometer, Becton Dickinson). Los agregados de plaquetas-leucocitos fueron definidos como los eventos CD41⁺/CD45⁺.

4.9 Condiciones de cultivo de las células MEG-01

Las células MEG-01 constituyen una línea celular megacarioblástica humana. Estas células se cultivaron en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco, Madrid, España) suplementado con 10% de suero fetal bovino (ICN, Madrid, España), 100 U/ml Penicilina G (Gibco, Madrid, España) y 100 μ g/ml de estreptomicina (Gibco, Madrid, España). Las células se incubaron a 37°C en aire saturado de humedad y con un 5% de CO₂.

4.10 Niveles endógenos de CD40 y CD40L en plaquetas y células MEG-01

Los contenidos endógenos de CD40L y de CD40 se determinaron en las plaquetas y en las células MEG-01 mediante Western blot.

En un primer paso, las células lavadas fueron lisadas con tampón Tritón (1% de Tritón X-100; 0,05 % de Tween-20; 300 mM de NaCl y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo en tampón fosfato salino con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Mini, EDTA free; Roche, Barcelona, España). La concentración de proteínas de las muestras se determinó

mediante el método de Bradford siguiendo las indicaciones del fabricante (Reactivo de Bradford, Bio-Rad, Madrid, España).

A continuación se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) en condiciones reductoras. Las muestras con los lisados de las plaquetas y las células MEG-01 se calentaron a 100°C durante 5 minutos y se cargaron en los pocillos del gel. Las electroforesis se realizaron a 100 V durante 2,5 horas.

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Madrid, España) con la ayuda de un sistema de transferencia semihúmedo (Trans-blot semidry transfer cell; Bio-Rad, Madrid, España) utilizando un tampón de transferencia compuesto de Tris/HCl 48 mM pH 8,3; glicina 39 mM; SDS 0,037% y metanol 20%. La transferencia se realizó a 20 V durante 45 minutos.

En un siguiente paso, las membranas se bloquearon con una solución al 1% de albúmina fetal bovina en tampón Tris Buffer Salino (TBS, Sigma-Aldrich Química SL, Madrid, España) durante 1 hora.

Las proteínas celulares fijadas en las membranas de nitrocelulosa se analizaron con anticuerpos específicos. Los pesos moleculares de las proteínas detectadas se calcularon en relación a los marcadores de pesos moleculares estándares coloreados (Bio-Rad, Madrid, España) cargados en el gel junto con las muestras. En particular, las membranas se incubaron con un mAb anti-CD40L (TRAP-1 de BD Pharmingen, Madrid, España) o con un mAb anti-CD40 (LOB 11, sc-13528, Santa Cruz Biotech Inc, Santa Cruz, California, Estados Unidos de América). Las diluciones de los anticuerpos a utilizar y el tiempo de incubación se determinaron en cada caso. Finalizada la incubación, la membrana se lavó varias veces con TBS. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1 hora con un anticuerpo policlonal contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa (0,2 µg/ml) (BIO-RAD, Madrid, España). Finalizada esta incubación, se retiró la solución del anticuerpo y la membrana se lavó abundantemente.

Las membranas se revelaron con el reactivo ECL (Amersham, Reino Unido) mediante quimioluminiscencia. Este procedimiento se basa en la detección de luz emitida tras la oxidación de un sustrato quimioluminiscente (luminol) por la peroxidasa. La luz emitida es

captada por películas radiográficas (verificar marca, Madrid, España) que posteriormente se revelan. El análisis densitométrico de las señales de las proteínas en el film se realizó con el programa informático de imagen *NIH Image* de la página <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>.

4.11 Exposición de CD40L en la superficie de plaquetas y células MEG-01

La exposición de CD40L se determinó en la superficie de las plaquetas lavadas y de las células MEG-01 mediante citometría de flujo en un citómetro FACScan (Becton Dickinson, Madrid, España).

Las células se resuspendieron en tampón HEPES ajustando el número de células a 1×10^5 células/100 μ l. A continuación se incubaron a temperatura ambiente en ausencia y presencia de TRAP 100 μ M o de ADP 20 μ M. La incubación se realizó durante diferentes tiempos (5, 30, 60 y 120 minutos después del estímulo).

Para estudiar la participación de las MMP-2 y MMP-9 en la liberación del sCD40L de la superficie de las plaquetas y las células MEG-01, las células fueron incubadas en la ausencia o presencia de GM6001 (30 μ M), inhibidor de MMPs de amplio espectro (US Biological, Salem, Massachusetts, Estados Unidos de América), o de MMP-9-I-I (100 μ M), un inhibidor específico de MMP9 (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) simultáneamente con los agonistas activadores plaquetarios.

Inmediatamente después de cumplidos los tiempos de incubación, las células fueron fijadas a temperatura ambiente con solución de formaldehído al 1% durante 20 minutos. A continuación fueron lavadas y centrifugadas a 650 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. El sedimento fue resuspendido en tampón HEPES e incubado durante 20 minutos, en la oscuridad y a temperatura ambiente, con una solución de mAb dirigido contra el CD40L o su control isotópico correspondiente, ambos marcados con ficoeritrina (BD Pharmingen, Madrid, España).

4.12 Determinación de los niveles antigénicos de sCD40L en plasma y sobrenadante de plaquetas y células MEG-01

La concentración de sCD40L fue determinada en el plasma pobre en plaquetas (PPP) y en el sobrenadante de plaquetas lavadas y de células MEG-01 en condiciones basales y tras un estímulo con TRAP.

Primero, una suspensión plaquetas lavadas (1×10^8 plaquetas) y de células MEG-01 (1×10^6 células) se centrifugaron a 650 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sedimento obtenido se resuspendió en 250 μ l de buffer HEPES. A continuación las suspensiones de células se mantuvieron en ausencia o presencia de TRAP 100 μ M durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se obtuvieron los sobrenadantes mediante centrifugación a 800 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se almacenaron a -80 $^{\circ}$ C hasta su análisis. La concentración de sCD40L se determinó por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos de América) y se expresó en pg/ml en el PPP y en pg/ 10^8 plaquetas o pg/ 10^6 células MEG-01 para el sobrenadante de plaquetas lavadas o de células MEG-01 respectivamente.

4.13 Determinación de la actividad gelatinolítica de la MMP-2 y la MMP-9 en el lisado y sobrenadante de plaquetas y células MEG-01

La actividad de las MMP-2 y MMP-9 se determinó en el sobrenadante y en el lisado de las plaquetas lavadas y de las células MEG-01 mediante zimografía en gel.

Para determinar la actividad de las MMPs en el sobrenadante de plaquetas lavadas, una suspensión de 1×10^8 plaquetas en 100 μ l de tampón HEPES fue incubada en condiciones basales a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación se recogió el sobrenadante mediante centrifugación a 800 x g durante 5 minutos y a temperatura ambiente. En el caso de las células MEG-01, suspensiones de 1×10^6 células en 100 μ l de tampón HEPES fueron incubadas en RPMI sin suero durante 24, 48 y 72 h en ausencia o con 1 y 10 ng/ml de sCD40L humano recombinante (Peprotech, Paris, Francia) en presencia de 2 μ g/ml de un mAb neutralizante contra el CD40 humano (clon 82102) o contra el CD40L humano (clon 40804) o con la inmunoglobulina de ratón IgG2B como control isotópico (clon 20116). Todos los

anticuerpos utilizados fueron de R&D Systems (Mineápolis, Estados Unidos de América). El medio de cultivo de las células se renovó todos los días.

La actividad gelatinolítica se determinó en 25 μ g de proteína de las células lisadas (buffer de lisis: Tris-HCl 20 mM; pH 7,5; NaCl 137 mM; Nonidet P-40 1% y glicerol 10%) y en 50 μ g de proteínas del sobrenadante de las plaquetas lavadas y de las células MEG-01. Las proteínas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 10% con SDS y 0,1% de gelatina (Sigma, Madrid, España) en condiciones no reductoras. Después de la electroforesis, los geles se lavaron con Triton X-100 (2,5 %) durante 1 h, cambiando la solución cada 20 minutos, y luego con agua destilada durante 30 minutos, para eliminar el SDS. A continuación se incubaron en tampón de zimografía (50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 , y 100 mM NaCl; pH 7,5) durante toda noche a 37°C. Después de la incubación los geles se tiñeron con Azul de Coomassie al 0,2% y las áreas de actividad gelatinolítica se visualizaron como bandas transparentes. Las bandas se cuantificaron en un densitómetro (Molecular Dynamics, Sunnyvale, California, Estados Unidos de América) usando el programa Quantity-One TM (Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos de América).

4.14 Determinación de la concentración de MMP-9 en plasma

La concentración de MMP-9 fue determinada en PPP mediante un ELISA comercial (Bender MedSystems GmbH Vienna, Austria).

4.15 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar, la mediana y el rango (percentil 25-75) o como valor relativo (porcentaje del total). Para evaluar la normalidad de la muestra de datos se utilizó el test de Shapiro-Wilk. Según la distribución de los datos se utilizaron el test no pareado de Student o el test de Mann-Whitney para la comparación entre grupos y el test de correlación de Pearson o el de Spearman para el cálculo de la asociación entre las variables. El estudio estadístico fue realizado mediante el programa SPSS para Windows, versión 17.0 (SPSS, Chicago, Illinois, Estados Unidos de América). Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

5. Resultados

5.1 Sujetos incluidos

Se entrevistaron en total 33 pacientes con EB. Del total de pacientes entrevistados se excluyeron 10 pacientes porque cumplían al menos 1 criterio de exclusión (6 pacientes estaban en tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos, 3 en tratamiento con anticonceptivos orales y 1 paciente estaba diagnosticado de diabetes de tipo 1). Ninguno de los pacientes excluidos presentaba signos o síntomas de trombosis. Las características clínicas y los tratamientos de los 23 pacientes incluidos en el estudio aparecen recogidos en las tablas 3 y 4 respectivamente. En la tabla 5 se recogen los datos de edad y género de todos los participantes. Se incluyeron 33 controles sanos.

Tabla 3: Características clínicas de los pacientes con EB en el momento de la inclusión en el estudio e histórico. AE: Actividad de la enfermedad; DE: desviación estándar; p25: percentil 25; p75: percentil 75.

Características clínicas, N=23	En la inclusión	Histórico
Duración de la enfermedad (años) (media \pm DE)	15 \pm 8	-
Trombosis venosa profunda (%)	0	4
AE; mediana (p25-p75)	7 (2-18)	-
Pacientes con AE>0 (%)	78	-
Úlceras genitales (%)	13	97
Úlceras orales (%)	52	100
Lesiones en la piel (%)	43	90
Eventos vasculares (%)	0	21
Eventos articulares (%)	43	67
Eventos gastrointestinales (%)	30	32
Eventos oculares (%)	22	64
Eventos neurológicos (%)	43	72

Tabla 4: Tratamiento del grupo de pacientes con EB en el momento de la inclusión e histórico.

Pacientes con EB, N=23		En la inclusión	Histórico
Tratamientos	Prednisona (< 10 mg) (%)	9	83
	Prednisona (> 10 mg) (%)	18	87
	Ciclosporina (%)	4	18
	Azatioprina (%)	9	32
	Metotrexato (%)	4	7
	Infliximab (%)	4	3
	Rituximab (%)	4	7
	Colchicina (%)	17	86

Tabla 5: Edad y sexo de los sujetos incluidos en el estudio.

Parámetro	Behçet (N= 23)	Controles (N= 33)	Valor de p
Edad (años); media \pm DE	49 \pm 15	43 \pm 10	0,082
Sexo femenino (%)	78	63	0,241

5.2 Tromboelastometría Rotacional (ROTEM®)

El ROTEM® mostró un perfil procoagulante en los pacientes con EB. En este grupo encontramos valores significativamente mayores en la fortaleza máxima del coágulo (INTEM-MCF) y en la velocidad de formación del coágulo (evaluada por los parámetros INTEM- α e INTEM-CFT) (tabla 6). La contribución plaquetaria a la fortaleza máxima del coágulo, determinada por la variable CP (MCF), fue similar en ambos grupos de sujetos (tabla 6).

Tras analizar la correlación entre los parámetros del ROTEM® y los valores plasmáticos de otras variables observamos una correlación entre el INTEM-MCF y los niveles plasmáticos del fibrinógeno en los dos grupos estudiados (pacientes: $r = 0,620$; $p = 0,005$; controles: $r = 0,638$; $p = 0,002$).

Tabla 6: Valores obtenidos mediante tromboelastometría rotacional (ROTEM®) en pacientes con EB y controles sanos. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de sujetos en el INTEM- α , el INTEM-CFT y en el INTEM-MCF. La contribución plaquetaria al MCF [CP (MCF)] fue similar en ambos grupos. Se muestran la media \pm DE o la mediana (p25-p75). *diferencias estadísticamente significativas.

Parámetro	Behçet (N= 23)	Controles (N= 33)	Valor de p
INTEM- α (grados)	77 \pm 3	74 \pm 2	< 0,010*
INTEM-CFT (segundos)	66 \pm 15	80 \pm 14	< 0,010*
INTEM-MCF (mm)	61 \pm 4	57 \pm 4	< 0,010*
CP (MCF) (%)	78 (69-79)	79 (77-81)	0,09

En el grupo de los pacientes con EB, la cinética de formación del coágulo se vio afectada por los niveles de PAI-1. Así, los valores obtenidos en el INTEM-MCF, el INTEM- α y el INTEM-CFT se correlacionaron significativamente con los niveles de PAI-1 en este grupo (INTEM-MCF: $r = 0,648$; $p = 0,012$; INTEM- α : $r = 0,650$; $p = 0,012$ and INTEM-CFT: $r = -0,690$; $p = 0,006$). El PAI-1 tuvo un efecto similar sobre la formación del coágulo en el grupo control. En este grupo, los valores de PAI-1 se correlacionaron significativamente con los valores del INTEM-CFT ($r = 0,645$; $p = 0,044$).

Por otro lado, se encontró una correlación significativa entre los valores del INTEM-MCF y los niveles de la proteína C reactiva en el grupo de pacientes con EB ($r = 0,384$; $p = 0,020$) pero no en el grupo control.

5.3 Trombinografía Automática Calibrada (CAT)

El CAT mostró un perfil hipercoagulable en los pacientes con EB. En este grupo, la *altura del pico*, el *potencial endógeno de trombina* y el *índice de la velocidad* fueron significativamente mayores que los encontrados en el grupo control (tabla 7). Sin embargo los pacientes con EB mostraron un *tiempo de latencia* alargado en comparación con el grupo control (tabla 7).

En los pacientes con EB, los niveles de fibrinógeno se correlacionaron con el *tiempo de latencia* ($r = 0,622$; $p = 0,004$), el *tiempo al pico* ($r = 0,548$; $p = 0,015$) y el *potencial endógeno de trombina* ($r = 0,452$; $p = 0,05$) lo que indicó una marcada influencia de los niveles de fibrinógeno en los valores obtenidos en el CAT en este grupo de pacientes.

Cuando analizamos la relación entre los valores obtenidos en el CAT y en el ROTEM® encontramos que en los pacientes con EB existía una correlación negativa entre el *tiempo de latencia* y el INTEM-CFT ($r = -0,568$; $p = 0,007$) y una correlación positiva entre el *tiempo de latencia* y el INTEM- α ($r = 0,536$; $p = 0,012$) lo que indicó que el incremento en la fortaleza y la velocidad de formación del coágulo en este grupo de pacientes estuvo asociado a un retraso en el inicio de la generación de trombina. Además, en este grupo de pacientes también encontramos una correlación positiva entre la *altura del pico* y el INTEM- α ($r = 0,432$; $p = 0,05$), lo que reveló que el incremento en la velocidad de formación del coágulo observado en este grupo pudo estar relacionado con una mayor capacidad de generación de trombina.

Tabla 7: Valores obtenidos en la Trombinografía Automática Calibrada (CAT) en pacientes con EB y controles sanos. Se muestran la media \pm DE o la mediana (p25-p75). *diferencias estadísticamente significativas.

Parámetro	Behçet (N= 23)	Controles (N= 33)	Valor de p
Tiempo de latencia (minutos)	6,7 \pm 1,8	5,6 \pm 1,1	0,025*
Tiempo al pico (minutos)	9,6 \pm 1,9	9,0 \pm 1,4	0,24
Altura del pico (nM)	292 \pm 65	213 \pm 67	< 0,010*
Potencial Endógeno de Trombina (nM x minutos)	1543 \pm 331	1286 \pm 292	0,01*
Índice de la Velocidad (nM/minutos)	102 (83-127)	55 (42-90)	< 0,010*

5.4 Recuento de células y nivel plasmático de marcadores relacionados con la inflamación, la hemostasia y el daño y/o activación endotelial

En los pacientes con EB encontramos niveles incrementados de fibrinógeno, proteína C reactiva, PAI-1, el complejo trombina-antitrombina y la sCD62E (tabla 8). Sin embargo, el recuento plaquetario, el recuento de eritrocitos y los niveles de tPA fueron similares en ambos grupos de sujetos (tabla 8).

Tabla 8: Recuento de células y niveles plasmáticos de moléculas que participan en la hemostasia en ambos grupos de sujetos. TAT= complejo trombina-antitrombina III, tPA= activador tisular del plasminógeno, PAI-1= Inhibidor del activador del plasminógeno-1, sCD62E= E-selectina. Se muestran la media \pm DE o la mediana (p25-p75). *diferencias estadísticamente significativas.

Parámetro	Behçet (N= 23)	Controles (N= 33)	Valor de p
Recuento de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	217 (189-287)	227 (199-247)	0,785
Recuento de eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	4,2 \pm 0,4	4,3 \pm 0,4	0,244
Fibrinógeno (mg/l)	321 \pm 53	280 \pm 42	< 0,010*
TAT (ng/l)	19 (17-21)	15 (12-17)	< 0,010*
Dímero-d ($\mu\text{g/l}$)	293 \pm 65	270 \pm 86	0,48
tPA (antígeno) (ng/ml)	17,2 \pm 7,2	13,4 \pm 5,2	0,12
PAI-1 (antígeno) (ng/ml)	19,9 \pm 8,6	12,6 \pm 6,0	0,032*
sCD62E ($\mu\text{g/l}$)	24,2 \pm 9,3	16,8 \pm 8,4	0,04*
Proteína C reactiva (mg/dl)	0,20 (0,10-0,50)	0,10 (0,10-0,12)	0,046*

5.5 Relación entre la actividad de la enfermedad, la coagulación y el daño y/o activación endotelial

En los pacientes con EB observamos correlaciones estadísticamente significativas entre la actividad de la enfermedad y el INTEM-MCF, el INTEM- α y los niveles de sCD62E (Figura 15). Esto indicó que en este grupo de pacientes, una mayor actividad de la enfermedad estaba asociada a un incremento en la capacidad procoagulante del paciente y a un mayor daño y/o activación del endotelio.

Por otro lado, los niveles de sCD62E se correlacionaron con los valores obtenidos para el INTEM-CFT, el INTEM-MCF y el INTEM- α (Figura 16), sugiriendo una posible relación entre el daño y/o activación del endotelio y el estado hipercoagulable observado mediante el ROTEM® en los pacientes con EB.

En los pacientes con un estado activo de la enfermedad (actividad de la enfermedad > 0), los niveles antigénicos de PAI-1 se correlacionaron significativamente con la actividad de la enfermedad ($r = 0,739$; $p = 0,009$) y los niveles de sCD62E ($r = 0,640$; $p = 0,034$).

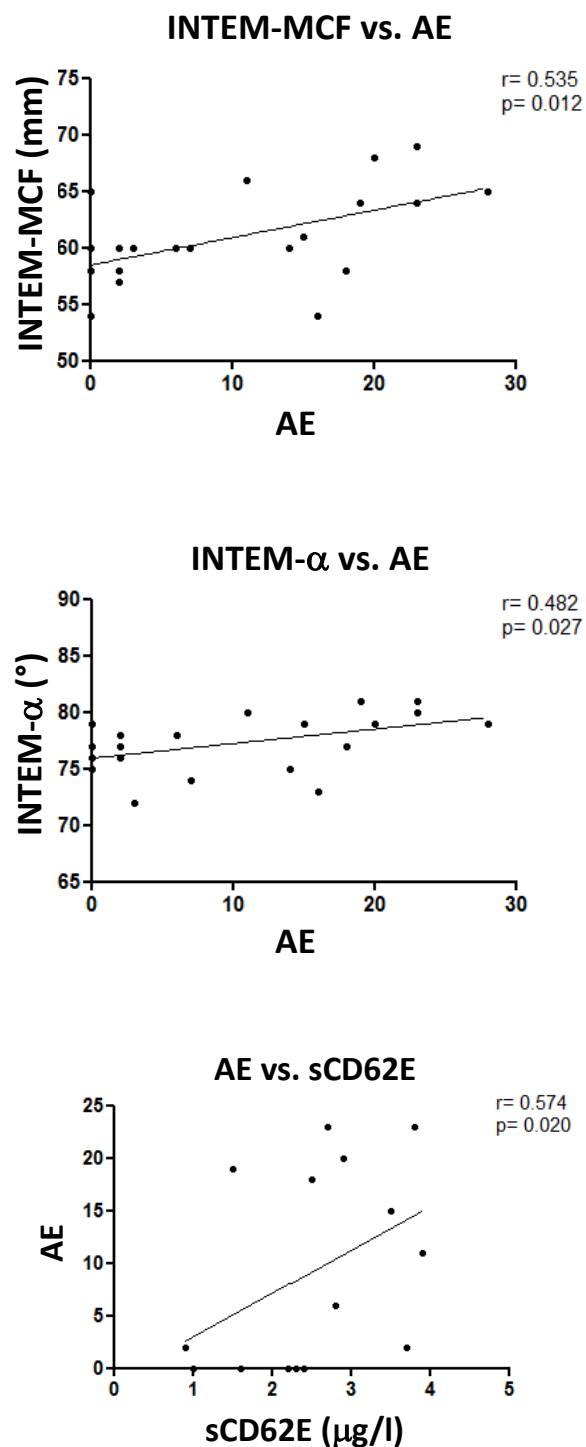


Figura 15: Diagramas de dispersión de puntos obtenidos mediante la representación de los pares de puntos correspondientes a los valores de la actividad de la enfermedad (AE) y los valores obtenidos en el INTEM-MCF, INTEM- α y los niveles de sCD62E en pacientes con EB. Se representa la recta de regresión correspondiente y se incluyen los valores del coeficiente de correlación (r) y el valor de la variable estadística p .

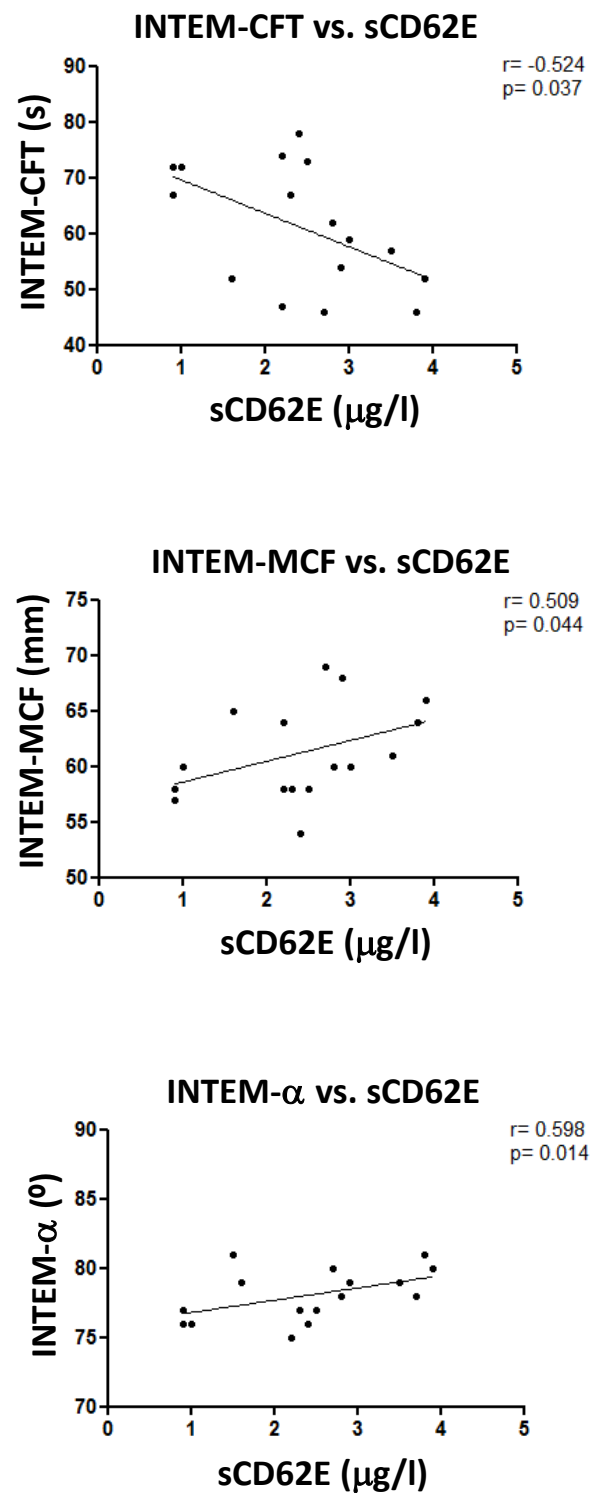


Figura 16: Diagramas de dispersión de puntos obtenidos mediante la representación de los pares de puntos correspondientes a los niveles de sCD62E y los valores obtenidos de INTEM-CFT, INTEM-MCF e INTEM- α . Se representa la recta de regresión correspondiente y se incluyen los valores del coeficiente de correlación (r) y el valor de la variable estadística p .

En cuanto al CAT, ninguno de los parámetros evaluados se correlacionó con los niveles de sCD62E o con la actividad de la enfermedad en los pacientes con EB. En el grupo control no se obtuvo ninguna correlación entre los niveles de sCD62E y las variables del ROTEM® o del CAT (no se muestran los datos).

5.6 Estudio de la activación plaquetaria

Dado que en este estudio hemos encontrado un estado hipercoagulable en los pacientes con EB, decidimos explorar la contribución plaquetaria a este fenómeno mediante el estudio del grado de activación plaquetaria.

Para determinar el grado de activación plaquetaria estudiamos en ambos grupos de sujetos algunos marcadores de activación plaquetaria tales como la unión del PAC1 y la expresión de P-selectina en la superficie de las plaquetas en estado basal y después de la estimulación con TRAP (100 μ M) o ADP (20 μ M). Los resultados de este estudio no arrojaron diferencias significativas en el estado de activación plaquetaria entre pacientes y controles en condiciones basales o después de la estimulación por TRAP o ADP (figuras 17 y 18).

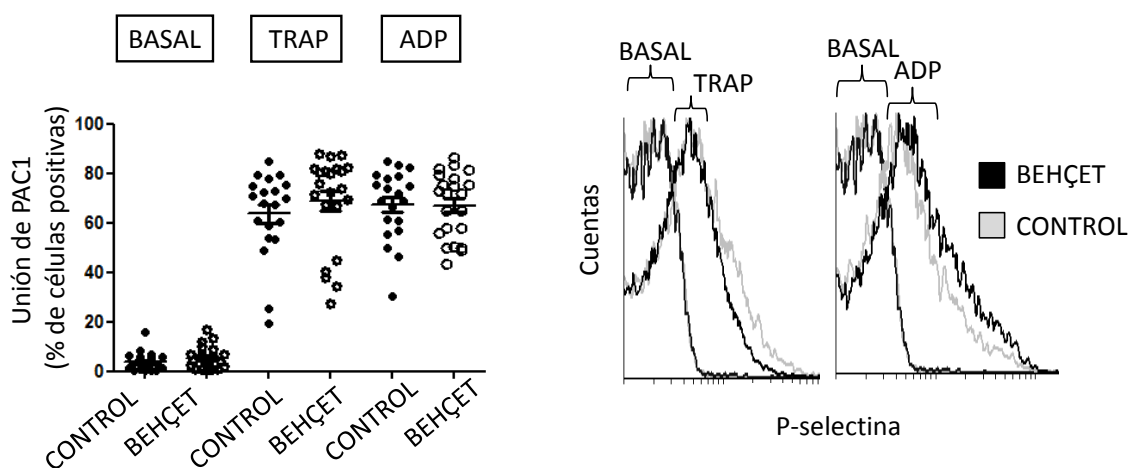


Figura 17: Unión de PAC1 a la superficie de las plaquetas. Las plaquetas de controles sanos (N=19) y de pacientes con EB (N=22) se mantuvieron en condiciones basales o se estimularon con TRAP (100 μ M) o ADP (20 μ M). La unión de PAC1 se determinó por citometría de flujo. En el panel de la izquierda, cada símbolo representa a un sujeto y las barras representan la media \pm DE. El panel de la derecha muestra histogramas representativos de los resultados de la citometría de flujo de un sujeto de cada grupo.

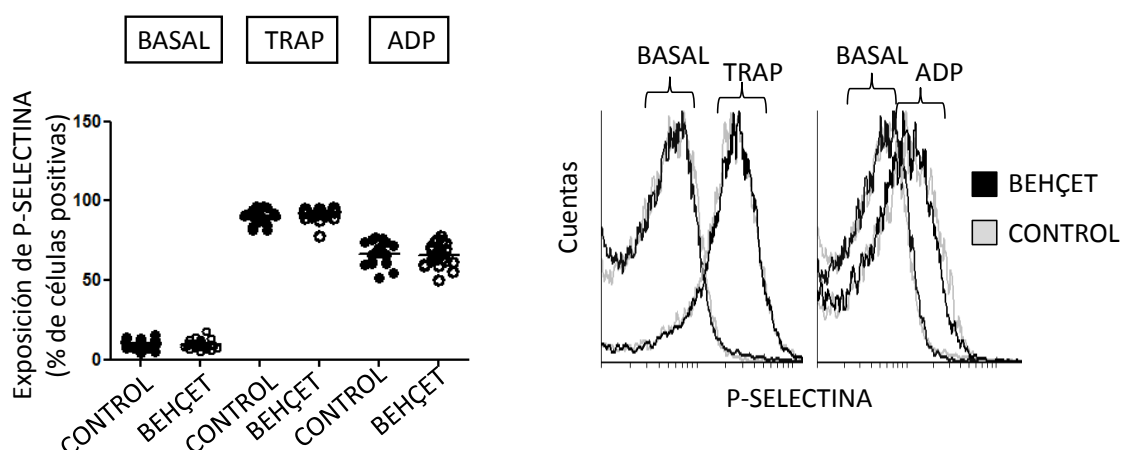


Figura 18: Exposición de P-selectina en la superficie de las plaquetas de los pacientes con EB (N=22) y de los controles (N=19) en condiciones basales y después de la estimulación con TRAP (100 μ M) o ADP (20 μ M). En el panel de la izquierda, cada símbolo representa a un sujeto. Las barras indican las media \pm DE de cada grupo. El panel de la derecha muestra histogramas representativos de un sujeto de cada grupo.

También evaluamos la activación plaquetaria en ambos grupos de sujetos mediante el estudio de la agregación plaquetaria inducida por agonistas (TRAP y ADP). En estos experimentos no encontramos diferencias significativas en la agregación plaquetaria entre el grupo de pacientes con EB y controles (figura 19).

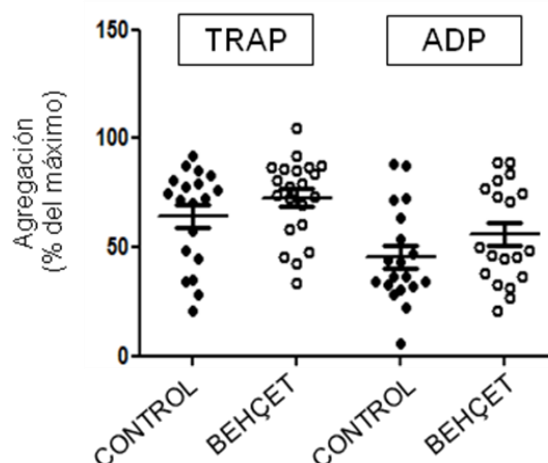


Figura 19: Agregación plaquetaria en pacientes con EB y controles sanos. Se muestra un diagrama de puntos que representa la agregación (% del máximo) del PRP de controles (N=19) y de pacientes con EB (N=22) después de la estimulación con TRAP (30 μ M) o ADP (40 μ M). Se muestran las medias \pm DE.

La identificación y cuantificación de agregados plaquetas-leucocitos es otra manera de evaluar la actividad plaquetaria. En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en el número de agregados entre el grupo de pacientes y de controles en condiciones basales

o después de la estimulación con TRAP (20 μ M) (figura 20). El bloqueo de la interacción CD40/CD40L, un importante mecanismo de interacción entre plaquetas y leucocitos, tampoco alteró la formación de estos agregados (figura 20). En la figura 21 se muestra a modo de ejemplo la distribución de eventos obtenida mediante citometría de flujo en un sujeto de cada grupo.

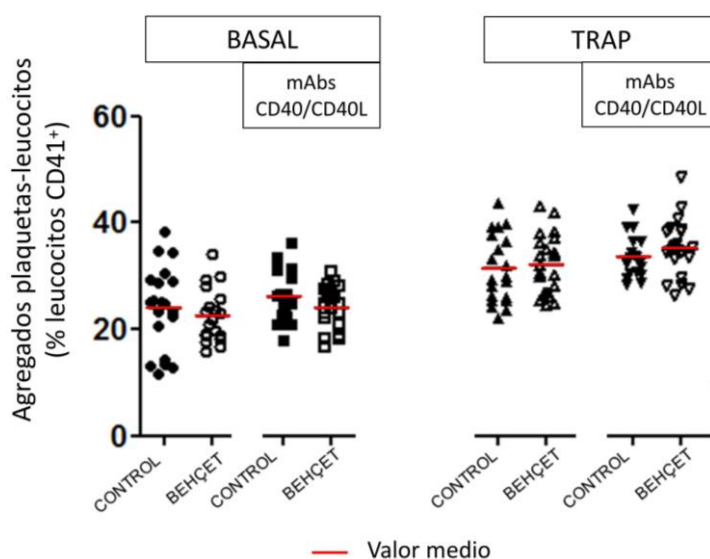


Figura 20: Porcentaje de agregados de plaqueta-leucocito en sangre completa de pacientes con EB (N= 22) y sujetos sanos (N=19) en condiciones basales o después de la estimulación con TRAP (20 μ M).

Es interesante comentar que en otros experimentos realizados por nuestro grupo, el bloqueo de la P-selectina con un anticuerpo específico disminuyó significativamente el número de agregados plaquetas-leucocitos formados en ambos grupos (no se muestran los datos) lo que demuestra la importancia de este tipo de selectina en la interacción entre estos dos grupos de células.

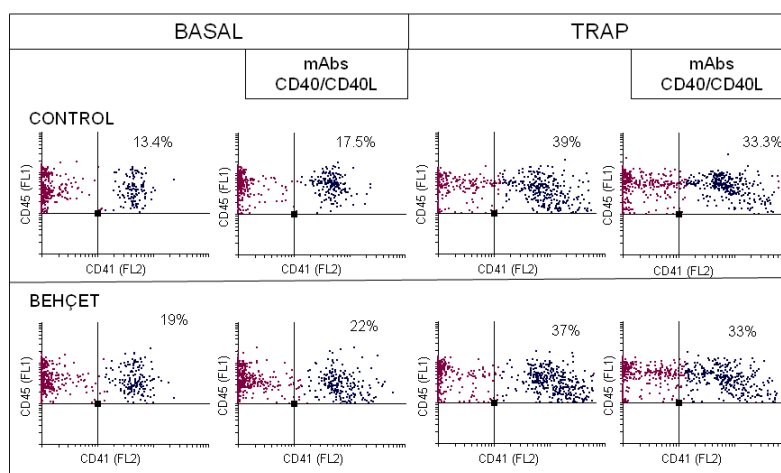


Figura 21: Distribución de eventos CD45⁺/CD41⁺ obtenida mediante citometría de flujo en un paciente con EB y en un sujeto sano. La adición de una mezcla de anticuerpos bloqueantes dirigidos contra el CD40 y el CD40L (mAbs CD40/CD40L) no alteró significativamente el porcentaje de eventos CD45⁺/CD41⁺ en ninguno de los sujetos.

5.7 Niveles plasmáticos de sCD40L

Como dijimos anteriormente, las plaquetas son la fuente principal de sCD40L, un mediador inflamatorio que constituye un nexo entre la inflamación y los procesos trombóticos. En este estudio encontramos que los pacientes con EB presentaron mayores niveles plasmáticos de sCD40L (2191 ± 1459 pg/ml; N=23) que el grupo control (183 ± 305 pg/ml; N=30; $p < 0,001$) (figura 22).

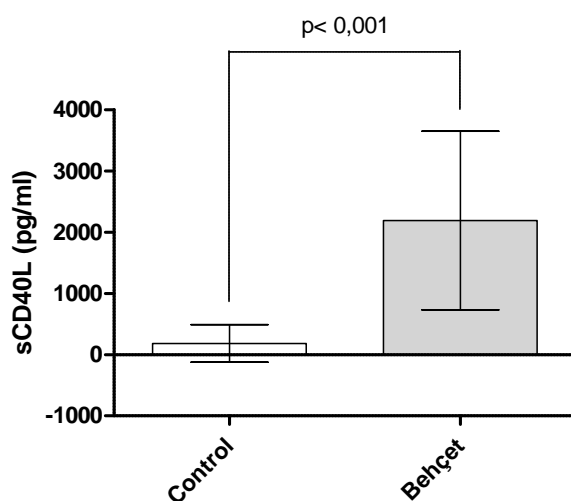


Figura 22: Niveles plasmáticos de sCD40L en pacientes y controles. La figura representa la media \pm DE de cada grupo.

Para estudiar la contribución de las plaquetas al aumento de los niveles plasmáticos de sCD40L, se determinó en ambos grupos de sujetos el contenido plaquetario de CD40L, la expresión de CD40L en la superficie de plaquetas y su liberación al espacio extracelular.

Las plaquetas de los pacientes con EB contenían mayor cantidad de CD40L que el grupo control (figura 23A) y expusieron en superficie más CD40L que los controles a los 5 y 60 minutos después de la estimulación con TRAP (figura 23B).

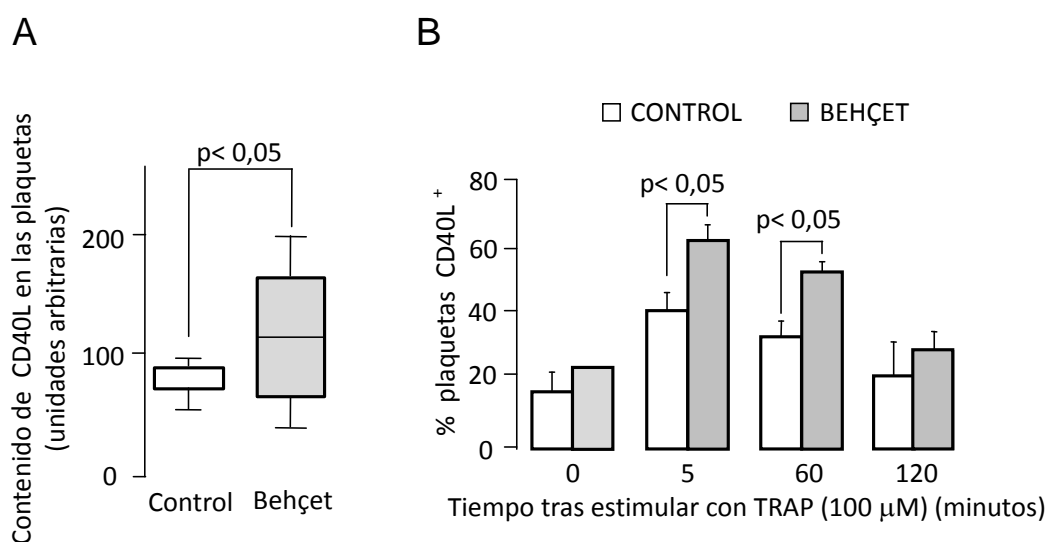


Figura 23: Contenido plaquetario y exposición plaquetaria de CD40L en pacientes con EB y controles sanos: (A) contenido de CD40L plaquetario (lisados de las plaquetas, 10 μ g de proteínas) determinado por análisis densitométrico de western blots (controles, N=9; pacientes con EB, N=12). Los valores se representan en diagrama de cajas de Tukey. (B) Exposición plaquetaria de CD40L determinado por citometría de flujo en condiciones basales y después de diferentes períodos de estimulación con TRAP (100 μ M) (en la figura B se muestran las medias y DE de ocho individuos por grupo).

Las plaquetas de los pacientes con EB liberaron mayor cantidad de sCD40L tanto en condiciones basales (figura 24) como en respuesta al estímulo con TRAP (100 μ M) (figura 25).

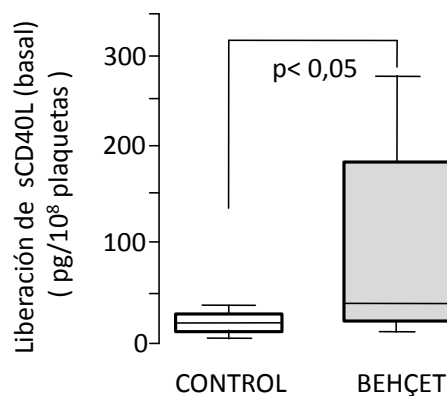


Figura 24: Liberación de sCD40L de origen plaquetario en condiciones basales en pacientes con EB y controles sanos. La concentración de sCD40L se determinó por ELISA en el sobrenadante de plaquetas lavadas incubadas durante 2 horas en condiciones basales (controles, N=9; pacientes con EB, N=12). Los valores se representan en diagrama de cajas de Tukey.

Debido a que existían datos que sugerían la participación de la metaloproteasas en la liberación de sCD40L plaquetario y que la MMP-9 ha sido relacionada con alteraciones vasculares, determinamos la contribución de la MMP-9 al aumento de los niveles plasmáticos de sCD40L en los pacientes con EB. En la figura 25 se muestra que la liberación de sCD40L de plaquetas estimuladas con TRAP de individuos control y de EB fue inhibida por un inhibidor específico de la MMP-9 (MMP-9-I-I) (100 μ M), lo que indicó que la MMP-9 podría estar relacionada con la liberación de sCD40L de plaquetas en ambos grupos de sujetos.

En cuanto a la expresión de CD40 en la superficie de las plaquetas, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos estudiados (figura 26).

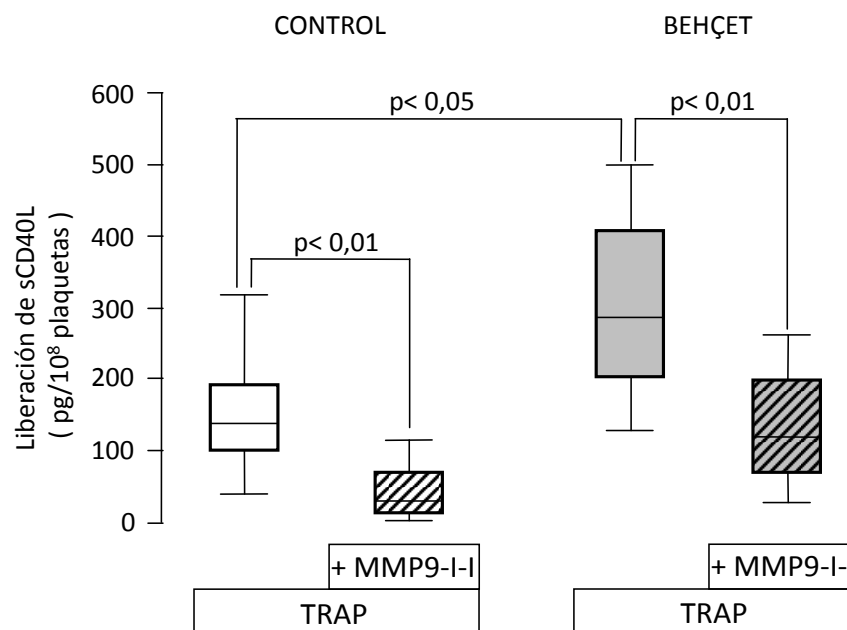


Figura 25: Liberación de sCD40L plaquetario tras la estimulación con TRAP y efecto de un inhibidor específico de MMP-9 (MMP9-I-I). Las plaquetas lavadas se incubaron durante 30 minutos con buffer Hepes o con MMP-9-I-I (100 μ M) y luego se estimularon con TRAP (100 μ M) durante 2 horas. La concentración de sCD40 se determinó por ELISA (controles, N=9; pacientes con EB, N=12). Los valores se representan en diagrama de cajas de Tukey.

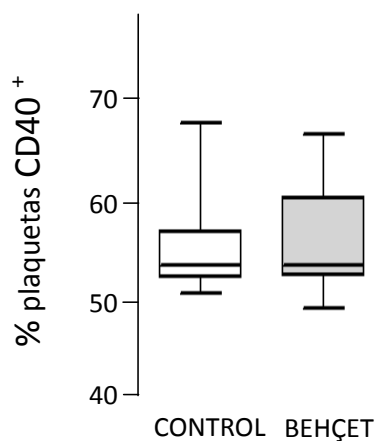


Figura 26: Expresión de CD40 en la superficie plaquetaria de pacientes (N=22) y de controles (N=19) en estado basal. Los valores se representan en diagrama de cajas de Tukey.

Los niveles de sCD40L y de MMP-9 también se determinaron en el sobrenadante de las plaquetas agregadas. Los resultados de este experimento indicaron que el grupo de pacientes con EB presentaban niveles significativamente mayores de MMP-9 (figura 27) y de sCD40L (figura 28) comparado con el grupo control.

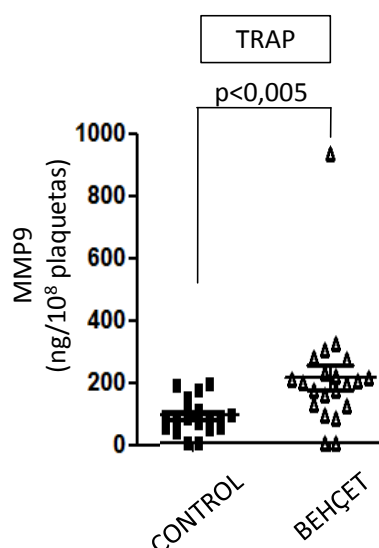


Figura 27: Niveles de MMP-9 medidos por ELISA en el sobrenadante de las plaquetas agregadas de los pacientes con EB (N=23) y de los controles sanos (N= 19). Se muestran las medias \pm DE de cada grupo.

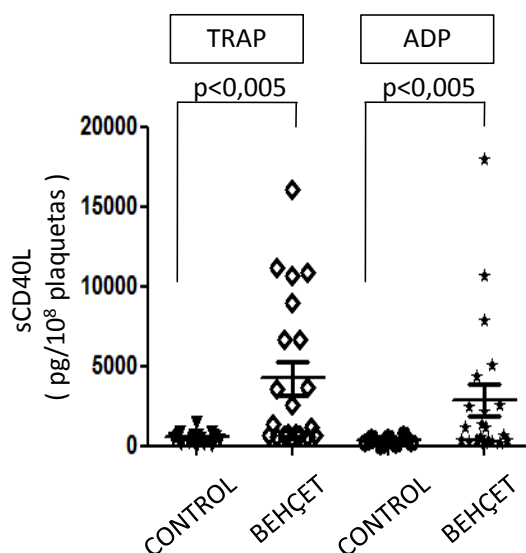


Figura 28: Cantidad de sCD40L (ng/10⁸ plaquetas) medidos por ELISA en el sobrenadante de las plaquetas agregadas de los pacientes con EB (N=22) y de los controles sanos (N=19). Las barras indican la media \pm DE.

Al estudiar la exposición de CD40L en la superficie plaquetaria tras la estimulación con TRAP y ADP encontramos un aumento significativo en la exposición de CD40L en la superficie de las plaquetas de los pacientes con EB comparado con el grupo control (figura 29).

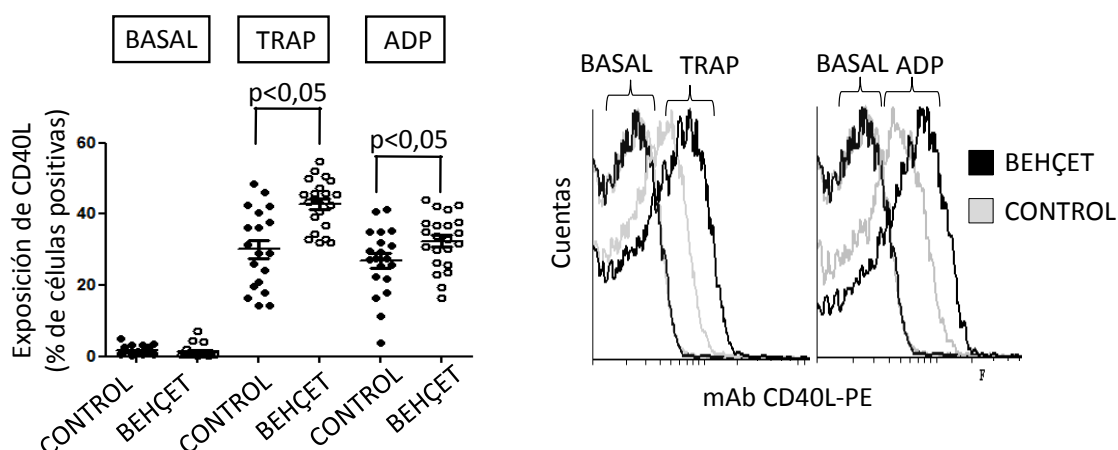


Figura 29: Exposición de CD40L en la superficie de las plaquetas. Las plaquetas de individuos controles (N=19) y de pacientes con EB (N=22) se mantuvieron en condiciones basales o se estimularon con TRAP (100 μ M) o ADP (20 μ M). En el panel de la izquierda cada símbolo representa a un individuo. Las barras indican la media \pm DE de cada grupo. Los paneles de la derecha muestran histogramas representativos de los resultados de la citometría de flujo de un sujeto de cada grupo. mAb: anticuerpo monoclonal; PE: Ficoeritrina.

5.8 Niveles antigénicos de MMP-9 en plasma y en plaquetas

Los niveles antigénicos de MMP-9 en plasma fueron significativamente mayores en los pacientes con EB que en los controles (pacientes con EB: $38,2 \pm 17$ ng/ml vs. controles: $23,3 \pm 13$ ng/ml; p < 0,05) (figura 30).

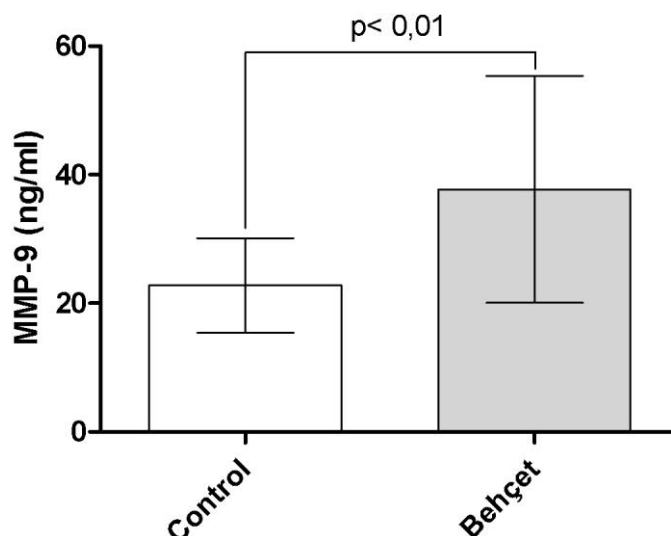


Figura 30: Concentración plasmática de MMP-9 en controles y en pacientes con EB. Se representa la media \pm DE de los valores de ambos grupos.

Los experimentos de liberación plaquetaria de sCD40L fueron realizados en plaquetas lavadas lo que sugirió que la MMP-9 involucrada en la liberación de sCD40L era de origen plaquetario. Como las plaquetas de los pacientes con EB eran capaces de liberar mayor cantidad de sCD40L que las de los controles, estudiamos si este aumento de la liberación de sCD40L estaba relacionado con un aumento en la actividad plaquetaria de la MMP-9.

La actividad de MMP-9 (formas monoméricas y diméricas) fue significativamente mayor en los sobrenadantes y en los lisados de las plaquetas de los pacientes con EB comparado con el grupo control (figura 31A y 31B). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la actividad de la MMP-2 entre ambos grupos (figura 31A).

En los pacientes con EB se observó una correlación significativa entre la actividad de la MMP-9 y la liberación de sCD40L en condiciones basales en el sobrenadante de las plaquetas lavadas ($r=0,744$; $p<0,05$) (figura 32).

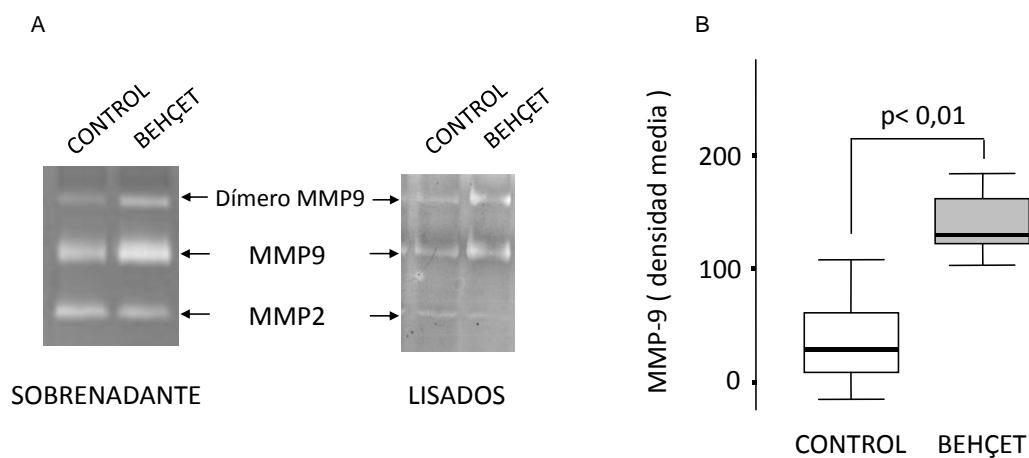


Figura 31: Actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9 en el sobrenadante y en lisados de las plaquetas de pacientes con EB y de controles sanos. Los sobrenadantes (75 μ g de proteína) y lisados (50 μ g de proteína) de plaquetas de controles y de pacientes con EB se analizaron por zimografía de gelatina en geles de acrilamida al 10%. A) Se muestran geles representativos de un control y de un paciente con EB. B) Análisis densitométrico de los geles para determinar la actividad de la MMP-9 en los sobrenadantes de controles (N=14) y de los pacientes con BD (N=14). Los valores se representan en diagrama de cajas de Tukey.

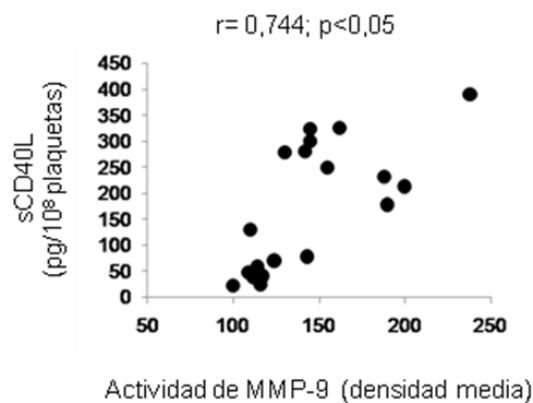


Figura 32: Representación de la concentración de sCD40L (pg/10⁸ plaquetas) vs. la actividad de MMP-9 (densidad media) en el sobrenadante de las plaquetas lavadas de pacientes con EB en estado basal.

La actividad de la MMP-9 del sobrenadante de las plaquetas lavadas se correlacionó con los niveles plasmáticos de sCD40L ($r=0,542$; $p<0,05$) (figura 33) y la actividad de la enfermedad ($r=0,599$; $p<0,05$) (figura 34).

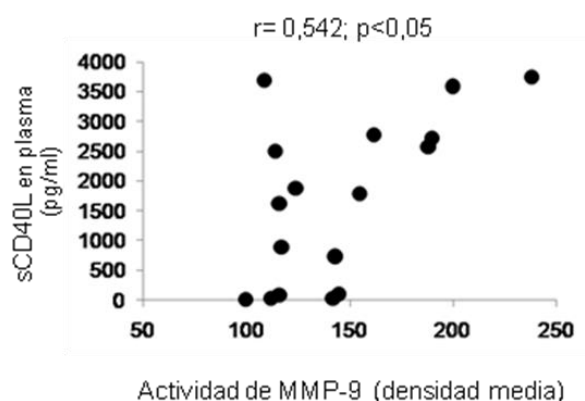


Figura 33: Niveles plasmáticos de sCD40L (pg/ml) vs. actividad de la MMP-9 (densidad media) en el sobrenadante de plaquetas lavadas de pacientes con EB.

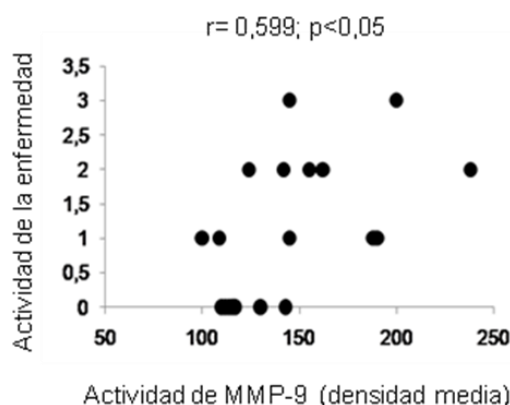


Figura 34: Actividad de la enfermedad vs. actividad de la MMP-9 (densidad media) en el sobrenadante de plaquetas de pacientes con EB.

De estos resultados podemos extraer dos conclusiones principales: 1- que la MMP-9 podría influir en los niveles de sCD40L plasmáticos y 2- que el aumento en los niveles de la MMP-9 están en relación con el proceso inflamatorio asociado a la EB.

5.9 Estudio del sistema CD40/CD40L en células MEG-01

Los datos obtenidos demuestran que existe una correlación significativa entre los niveles plasmáticos de sCD40L y la actividad de MMP-9 en el sobrenadante de las plaquetas del grupo de pacientes con EB (figura 33). Esto sugiere que la cantidad de MMP-9 contenida en las plaquetas podría ser regulada por los niveles plasmáticos de sCD40L. Debido a que la

regulación del contenido de MMP-9 en las plaquetas se realiza probablemente a nivel del megacariocito, utilizamos células MEG-01 (línea celular megacarioblástica) como modelo experimental.

En un primer paso, comprobamos que las células MEG-01 eran un modelo experimental apropiado para el estudio del sistema CD40/CD40L plaquetario. Para ello estudiamos en las células MEG-01 la exposición de CD40L después de la estimulación con TRAP así como la liberación de sCD40L y su asociación con la actividad de la MMP-9.

La exposición de CD40L en las células MEG-01 fue máxima a los 5 minutos después de la estimulación con TRAP (100 μ M) (figura 35A). Pasado este tiempo, la exposición de CD40L en estas células decreció paulatinamente (figura 35A). La disminución del porcentaje de células MEG-01 CD40L⁺ en función del tiempo fue debida probablemente a la liberación de sCD40L al medio extracelular ya que la presencia de un inhibidor universal de MMPs (GM6001) y el inhibidor específico de MMP-9 (MMP-9-I-I), disminuyeron parcialmente la liberación de sCD40L en las células MEG-01 estimuladas con TRAP 100 μ M (figura 35A y 35B).

Por otro lado, al igual que las plaquetas, las células MEG-01 expresaban el receptor CD40 (figura 36).

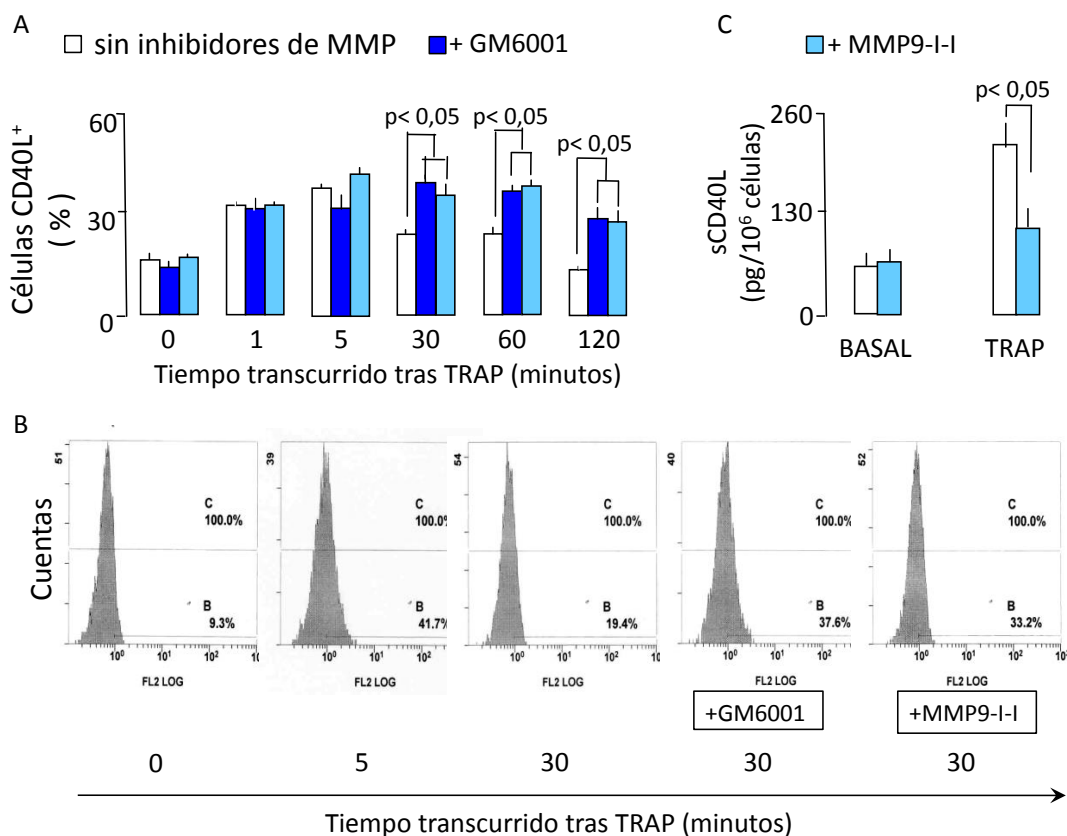


Figura 35: A) Exposición de CD40L en la superficie de células MEG-01 en función del tiempo en respuesta a la estimulación por TRAP (100 μ M). Se muestra el efecto de un inhibidor universal de las MMPs (GM6001) y el de un inhibidor específico de la MMP-9 (MMP9-I-I). Se representan las medias \pm DE de seis experimentos. B) Histograma de citometría de flujo tipo donde se observa que a los 30 minutos de incubación con TRAP la señal se desplaza hacia la izquierda reflejando la liberación de CD40L. Este desplazamiento es inhibido por la presencia de GM6001 y MMP-9-I-I. C) Concentración de sCD40L en el sobrenadante de 10^6 células MEG-01 en condiciones basales y tras la estimulación con TRAP (100 μ M) en ausencia o presencia de MMP-9-I-I (100 μ M) (se muestran las medias y DE de cuatro experimentos).

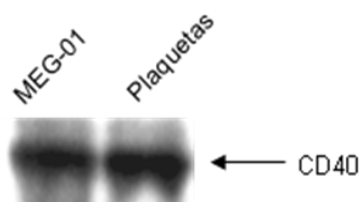


Figura 36: Expresión de CD40 en plaquetas y en células MEG-01. Los lisados de las células MEG-01 (25 μ g de proteínas) y de las plaquetas lavadas (15 μ g de proteínas) se analizaron por western blot para determinar la expresión de CD40. En este estudio se comprobó que las células MEG-01 son capaces de expresar CD40.

5.10 Estudio del efecto del sCD40L sobre la actividad de la MMP-9 de las células MEG-01

Una vez determinada la validez del uso de las células MEG-01 como modelo experimental, estudiamos en estas células la regulación de los niveles y actividad de la MMP-9 por el sCD40L.

Las zimografías de los lisados y de los sobrenadantes de las células MEG-01 incubadas con sCD40L mostraron una actividad gelatinolítica debido a la MMP-2 que era independiente de la cantidad de sCD40L presente en el medio y del tiempo de incubación con esta molécula (figura 35). En contraste, la actividad de la MMP-9 se incrementó con el aumento del tiempo de incubación y de la concentración de sCD40L (figura 37).

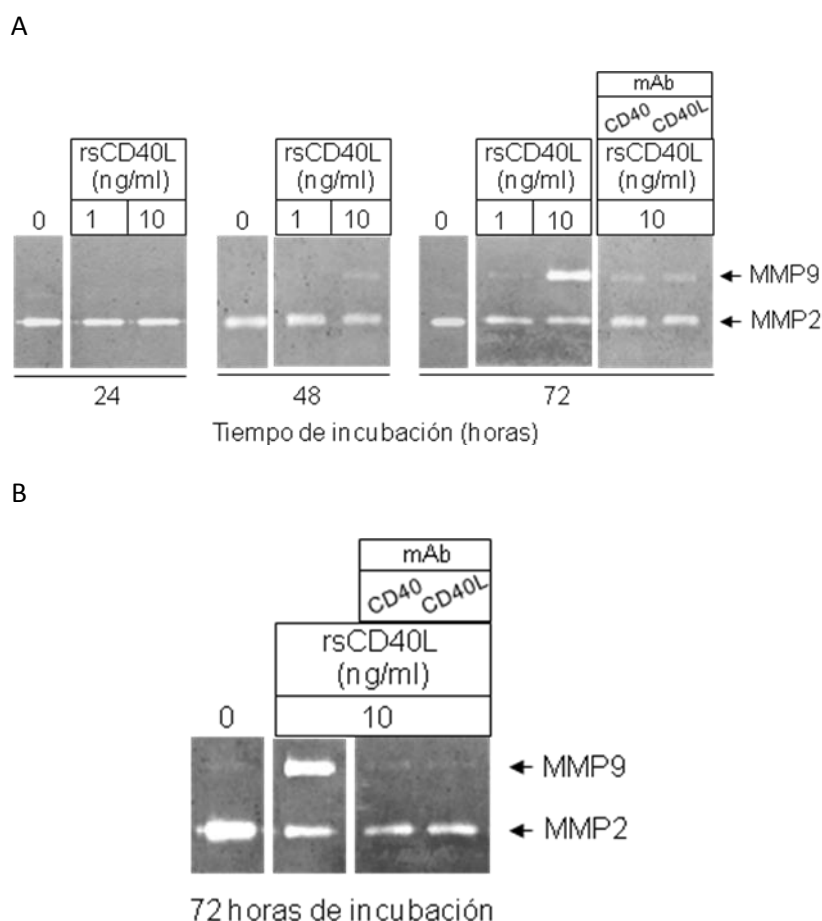


Figura 37: Efecto del sCD40L recombinante (rsCD40L) sobre el contenido de la MMP-9 en las células MEG-01. Las células MEG-01 se trataron durante 24 h, 48 h o 72 h con rsCD40L sólo o en presencia de mAb neutralizantes de CD40 y de CD40L. Los sobrenadantes (panel A) y los lisados (panel B) de las células MEG-01 se analizaron por zimografía en geles de poliacrilamida al 10% con gelatina. Se muestra un gel de zimografía como representativo de los cuatro experimentos realizados.

La adición de anticuerpos específicos bloqueantes del CD40 y del CD40L inhibieron el aumento de la actividad de MMP-9 dependiente del sCD40L (figura 37B) mientras que la adición de los anticuerpos inespecíficos del mismo isotipo que los usados no afectó el efecto del sCD40L sobre los niveles de la MMP-9 (no se muestran los datos). En conjunto estos datos demuestran que los niveles plasmáticos de sCD40L podrían influir en el contenido plaquetario de MMP-9.

6. Discusión

6.1 Técnicas globales para el estudio de la hemostasia: ROTEM® y CAT

En este estudio se aplican por primera vez dos pruebas globales de la hemostasia para evaluar el estado protrombótico de la EB. Nuestros datos aportan evidencias objetivas que demuestran que en esta enfermedad existe un estado de hipercoagulabilidad incluso en ausencia de trombosis. En los pacientes con EB se observó un aumento en la fortaleza y velocidad de formación del coágulo así como en la generación de trombina. Además, se encontró una dependencia entre los parámetros del ROTEM®, los niveles plasmáticos de sCD62E y la actividad de la enfermedad que indica que en la EB existe una relación entre el estado hipercoagulable, el daño y/o activación endotelial y la gravedad de los síntomas.

Para profundizar en el estudio de la hemostasia mediante ROTEM®, evaluamos algunos parámetros que pueden influir en los resultados de esta técnica como son el recuento de plaquetas y eritrocitos, el estado de activación plaquetaria y los niveles plasmáticos de fibrinógeno, PAI-1 y tPA. Por otro lado, para complementar el estudio de la generación de trombina (CAT) determinamos los niveles plasmáticos de TAT y dímero-d.

6.1.1 Recuento de plaquetas y de eritrocitos

Tanto el recuento de plaquetas como el de eritrocitos pueden influir sobre las propiedades viscoelásticas del coágulo [293, 294]. Sin embargo, en el presente estudio no encontramos diferencias significativas entre pacientes y controles en ambos parámetros por lo que creemos que no contribuyeron a las diferencias encontradas entre ambos grupos de sujetos en la velocidad de formación del coágulo y en su fortaleza máxima.

6.1.2 Estado de activación plaquetaria

Nuestros datos experimentales indicaron que la activación plaquetaria fue similar en ambos grupos de sujetos tanto en el estado basal como tras la estimulación con agonistas (TRAP y ADP). Este hallazgo descarta un aumento en la fortaleza y en la velocidad de formación del coágulo debido a una hiperactividad y/o hiperreactividad plaquetaria en los pacientes con EB. En contraste con nuestros resultados se encuentran los de otros estudios en los que se observó una mayor activación plaquetaria en respuesta al estímulo en pacientes con EB [105,

106]. Esta diferencia podría deberse a que, por ejemplo, los pacientes con EB incluidos en el trabajo de Martínez *et al.* tenían historia de trombosis venosa profunda mientras que en nuestro estudio sólo un 9% de los pacientes contaba con antecedentes de trombosis. Además, ninguno de los pacientes incluidos en el estudio de Martínez *et al.* tenía tratamiento inmunosupresor en el momento del análisis mientras que en nuestro estudio un 97% de los pacientes se encontraba en tratamiento inmunosupresor.

6.1.3 Fibrinógeno

En nuestro grupo de pacientes con EB los niveles de fibrinógeno estaban aumentados con respecto a los del grupo control, hallazgo que concuerda con lo observado en estudios previos sobre esta enfermedad [69, 102, 295, 296]. Este resultado no es sorprendente teniendo en cuenta que el fibrinógeno es un reactante de fase aguda [228, 297] y que la mayoría de los pacientes incluidos (78% del total) presentaban un estado activo de la enfermedad en el momento de la recogida de la muestra. El aumento en los niveles de fibrinógeno pudo estar involucrado en el perfil hipercoagulable observado mediante ROTEM® en nuestros pacientes con EB ya que el fibrinógeno tiene un efecto procoagulante sobre los parámetros del ROTEM® [230, 298, 299]. Nuestros resultados confirman esta observación ya que observamos en ambos grupos de sujetos una correlación positiva entre los niveles de fibrinógeno y los valores obtenidos en el INTEM-MCF. Sin embargo, aunque los valores del INTEM-MCF aumentaron con el incremento en los niveles de fibrinógeno y la actividad de la enfermedad, no pudimos encontrar una correlación entre estas dos últimas variables. Este hallazgo ha sido observado previamente en este tipo de pacientes [69] y pudo ser consecuencia de los múltiples mecanismos que influyen en la síntesis y en la degradación del fibrinógeno [300].

El incremento en los niveles de fibrinógeno en los pacientes con EB pudo contribuir al aumento de la generación de trombina en este grupo. En sujetos sanos el fibrinógeno produce un incremento del *tiempo de latencia*, y un aumento en el *potencial endógeno de trombina* y la *altura del pico* [233]. Este efecto dual del fibrinógeno podría ser consecuencia de la capacidad de unión de la trombina a sus diferentes sustratos. Un incremento en los niveles de fibrinógeno podría prolongar el *tiempo de latencia* debido a la unión del fibrinógeno al exosito II de la trombina ya que el exosito II también participa en la unión del FVIII a la trombina y a su activación por esta enzima. La unión del fibrinógeno a este exosito podría producir un efecto

anticoagulante en presencia de concentraciones bajas de FT en las que la generación de trombina transcurre principalmente a través de la vía intrínseca de la coagulación [301, 302]. Esta hipótesis se apoya en alguno de los datos obtenidos por Hemker *et al.* en el estudio de la generación de trombina en plasma con y sin fibrinógeno [234]. Por otro lado, un incremento en las concentraciones de fibrinógeno puede facilitar la producción de fibrina y ésta, a su vez, puede inhibir la actividad de la AT-III, uno de los principales inhibidores de la trombina, contribuyendo al mantenimiento de niveles de trombina más elevados [234, 303]. Nuestros resultados concuerdan con estos datos ya que encontramos una correlación positiva entre los niveles de fibrinógeno y el *potencial endógeno de trombina* en el grupo de pacientes con la EB. Es interesante resaltar en este punto que los pacientes con síndrome antifosfolípido también presentan un aumento del *tiempo de latencia* [304], por lo que un aumento en los valores de este parámetro no descarta la presencia de un estado protrombótico.

6.1.4 PAI-1 y tPA

Existen evidencias que demuestran que algunas alteraciones en la ruta de la fibrinólisis están relacionadas con el desarrollo de trombosis, aterosclerosis y estenosis vascular [305]. La fibrinólisis ha sido estudiada con anterioridad en la EB pero los datos son escasos y contradictorios [69, 81, 84, 306-309]. En el presente estudio no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles antigénicos de tPA entre los grupos estudiados. Sin embargo, los niveles antigénicos de PAI-1 fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes con EB lo que sugirió la presencia de un estado hipofibrinolítico en este grupo. El aumento en los niveles de PAI-1 podría originar un incremento en la fortaleza y en la velocidad de formación del coágulo [310, 311] debido a una inhibición irreversible de la actividad del tPA, el principal activador plasmático del plasminógeno [253]. Nuestros resultados experimentales concuerdan con esta hipótesis ya que en el grupo de pacientes con EB encontramos una correlación estadísticamente significativa entre los niveles antigénicos de PAI-1 y tres parámetros del ROTEM®: el INTEM-CFT, el INTEM- α y el INTEM-MCF lo cual señala al PAI-1 como un elemento crucial en el estado protrombótico observado en este grupo.

Las causas que pudieron originar un aumento en los niveles plasmáticos de PAI-1 en nuestro grupo de pacientes con EB pudieron ser varias. Por ejemplo, la mayoría de los pacientes (un 78% del total) se encontraban en la fase activa de la enfermedad en el momento

del estudio lo que pudo originar un aumento en los niveles de $\text{TNF-}\alpha$, una potente citoquina proinflamatoria que se encuentra incrementada en los pacientes con EB en fase activa [312-314] y que es capaz de estimular la síntesis y la liberación de PAI-1 por las células endoteliales [315-317]. Por otro lado, la mayor capacidad de generación de trombina observada en el grupo de pacientes con EB podría contribuir indirectamente al aumento de los niveles de PAI-1 a través de la acción estimulante de la trombina sobre la síntesis y liberación plaquetaria de esta proteína [318-320]. Adicionalmente, la trombina es capaz de activar la síntesis y la secreción plaquetaria de $\text{TGF-}\beta$ [321, 322], un importante estimulante de la síntesis endotelial de PAI-1 [321-323].

La importancia clínica del PAI-1 en la EB no es conocida. A pesar de que no se ha descrito una asociación entre los niveles de PAI-1 y la trombosis en la EB, se ha observado una mejoría de los síntomas vasculares y de las úlceras orales después del tratamiento con agentes antifibrinolíticos [324, 325]. Por otro lado, además de nosotros, otros grupos de investigadores han observado una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de PAI-1 y la actividad de la enfermedad [69, 80], lo que apoya la hipótesis sobre la probable existencia de una relación entre el estado hipofibrinolítico y la gravedad de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales con un mayor número de pacientes para confirmar esta relación causal que, de ser cierta, podría significar el hallazgo de una nueva diana terapéutica para el tratamiento de esta patología.

6.1.5 TAT y dímero-d

El estado hipercoagulable observado en los pacientes con EB, mediante el CAT y el ROTEM® fue corroborado por el aumento de los niveles plasmáticos del complejo trombina-antitrombina III (TAT), un marcador plasmático de la formación de trombina. Sin embargo los niveles de TAT no se correlacionaron con los parámetros del ROTEM® o del CAT en ninguno de los grupos estudiados. Este comportamiento concuerda con los resultados de otros estudios [326-328] e indica que la concentración plasmática de TAT no refleja necesariamente la capacidad de generación de trombina del paciente en el momento de la toma de muestra y que por lo tanto, no es un marcador que refleja obligatoriamente el estado procoagulante del paciente en el momento del análisis.

Otro de los marcadores analizados fue el dímero-d (DD). En contraste con estudios previos en donde se observaron niveles elevados de DD en pacientes con EB activa y trombosis venosa profunda [329], en nuestro estudio no encontramos diferencias entre ambos grupos de sujetos. Este resultado pudo ser debido a la ausencia de signos, síntomas o historia reciente de trombosis en nuestro grupo de pacientes. Creemos que este resultado indica que el DD no es un marcador útil para evaluar el estado procoagulante del paciente en ausencia de trombosis.

6.2 Activación y/o daño endotelial

El daño y/o activación endotelial podría ser un factor clave en el desarrollo del estado protrombótico de la EB [81, 89]. En el presente estudio utilizamos los niveles de sCD62E como un marcador del daño y/o activación del endotelio. Existen datos previos que indican que los niveles de sCD62E están elevados en la fase activa de la EB [91]. Nuestros resultados se encuentran en esta misma dirección ya que la mayoría de nuestros pacientes se encontraban en la fase activa de la enfermedad en el momento del estudio y presentaban niveles plasmáticos más elevados de sCD62E que el grupo control. Al analizar la correlación entre los niveles de sCD62E y los parámetros del ROTEM® y del CAT, encontramos una correlación significativa entre los niveles de sCD62E y los parámetros del ROTEM® pero no entre los niveles de sCD62E y los parámetros del CAT. En este punto es interesante destacar que tampoco observamos una correlación entre los parámetros del CAT y la actividad de la enfermedad que, por el contrario, sí mostró una correlación significativa con el perfil hipercoagulable observado mediante el ROTEM®. La hipótesis que planteamos para explicar este comportamiento se basa en las características que diferencian a ambas técnicas. Mientras que el CAT sólo permite describir la capacidad de generación de trombina del plasma, el ROTEM® realiza una evaluación de un mayor número de procesos que participan en la hemostasia como son la generación de trombina, la formación del coágulo y la fibrinolisis. Nuestros datos experimentales indicaron que en los pacientes con EB existe un estado hipofibrinolítico que no puede ser evaluado por el test de generación de trombina. Por este motivo, el ROTEM® es un método de laboratorio más adecuado para detectar los cambios hemostáticos producidos por la alteración endotelial y la condición inflamatoria de la EB.

Los resultados del presente trabajo sugieren la necesidad de utilizar un tratamiento anticoagulante en la EB. Sin embargo, es un tema controvertido en el que no existe consenso entre los reumatólogos [330]. Esto se debe a que el tratamiento anticoagulante crónico podría

aumentar el riesgo de sufrir hemorragias importantes en estos pacientes [331]. Por otro lado, debido a que la trombosis en la EB se debe fundamentalmente a la afectación del endotelio vascular debido a la actuación de procesos de naturaleza inflamatoria, el uso de agentes inmunosupresores podría ser suficiente para disminuir el riesgo de trombosis en estos pacientes [120, 332].

6.3 Participación de las plaquetas en el estado inflamatorio de la EB

No existen trabajos previos sobre la actividad inmunomoduladora de las plaquetas en la EB. Teniendo en cuenta que existe una relación bidireccional entre la coagulación y la inflamación y que las plaquetas además de tener un papel central en la hemostasia son la fuente principal de sCD40L en el plasma, pensamos en la posible implicación de las plaquetas en el desarrollo del cuadro inflamatorio de la EB. Nuestros datos demuestran que las plaquetas de los pacientes con EB tienen mayor actividad de MMP-9 y liberan más sCD40L que las del grupo control. Dado que tanto la MMP-9 como el sCD40L están involucrados en el desarrollo de la respuesta inflamatoria, nuestros resultados indican una participación de las plaquetas en el proceso inflamatorio de la EB.

6.3.1 Papel de la MMP-9 plaquetaria

La vasculitis es una de las principales complicaciones clínicas que aparece en la EB y puede afectar a vasos sanguíneos de todos los calibres [70, 333]. La MMP-2 y la MMP-9 pueden actuar sobre la membrana basal del subendotelio originando alteraciones vasculares [334]. Existen estudios previos en pacientes con EB que relacionan el daño vascular y la actividad de la enfermedad con el aumento de los niveles de la MMP-2 y la MMP-9 [167, 335]. En otras enfermedades inflamatorias, como la enfermedad de Crohn, se ha descrito un aumento en la actividad de la MMP-9 plaquetaria [160]. En conjunto estos datos apoyan la hipótesis sobre una posible relación entre la actividad proinflamatoria de la MMP-2 y la MMP-9 plaquetaria y el estado proinflamatorio observado en la EB.

En nuestro estudio observamos que existía un incremento en la actividad de la MMP-9 plaquetaria de los pacientes con EB mientras que la actividad de la MMP-2 plaquetaria fue similar a la del grupo control. Además, al analizar la actividad gelatinolítica en el sobrenadante

de las plaquetas, sólo la actividad de la MMP-9 correlacionó con la actividad de la enfermedad. Ambos resultados indicaron que la MMP-9 podría estar involucrada en los mecanismos proinflamatorios de la EB.

Durante la formación del coágulo, la MMP-9 es liberada de las plaquetas activadas. De hecho, existen estudios que demuestran que los niveles de MMP-9 son significativamente mayores en el suero que en el plasma [336, 337]. Por lo tanto, podríamos inferir que el estado hipercoagulable presente en la EB podría ser la causa, al menos en parte, de los altos niveles circulantes de MMP-9 observados en nuestro grupo de pacientes.

6.3.2 Papel del sCD40L plaquetario

Las plaquetas activadas exponen CD40L en su superficie y este es liberado en forma de sCD40L hacia el espacio extracelular por la actividad proteasa de las MMPs [148]. Nuestros resultados demuestran que la MMP-9 es la responsable, al menos en parte, de la liberación de sCD40L de la superficie plaquetaria ya que un inhibidor específico de la MMP-9 inhibió la liberación de sCD40L al medio extracelular. Además, la buena correlación encontrada entre la actividad de MMP-9 y los niveles de sCD40L liberado de las plaquetas apoya también la hipótesis sobre la participación de la MMP-9 en la escisión del CD40L de la superficie plaquetaria.

En nuestro estudio no encontramos una correlación entre los niveles plasmáticos de sCD40L y el recuento de plaquetas. Este resultado podría parecer contradictorio teniendo en cuenta que las plaquetas son la principal fuente del sCD40L del plasma, pero en la literatura podemos encontrar algunos ejemplos en ambos sentidos. Por ejemplo, en un estudio en pacientes adultos con enfermedad cardiovascular, una patología que presenta niveles elevados de sCD40L, no se encontró una correlación entre el recuento de plaquetas y los niveles de sCD40L [338]. Por el contrario, en otro estudio en pacientes con trombocitemia esencial se observó un incremento en los niveles de sCD40L con el aumento en el recuento de las plaquetas [339]. Estos datos indican que además del recuento plaquetario existen otros factores que determinan los niveles plasmáticos de sCD40L.

Otra enfermedad en la que se observa un aumento en los niveles plasmáticos de sCD40L es la enfermedad de Crohn. En estos pacientes los niveles elevados de sCD40L pueden incrementar el estado de activación plaquetaria [160]. Este efecto no fue observado en nuestro grupo de pacientes con EB a pesar de los niveles aumentados de sCD40L. Una hipótesis para explicar este comportamiento puede basarse en que los niveles plasmáticos de sCD40L en los pacientes con enfermedad de Crohn fueron seis veces más altos que los encontrados en nuestro grupo pacientes con EB (2.028 ± 1.245 pg / ml en EB vs. 12.536 ± 3.467 pg / ml en la enfermedad de Crohn), lo que sugiere que, si bien la concentración plasmática de sCD40L en la EB es alta, parece no ser suficiente para originar un activación plaquetaria. En la misma línea de nuestros resultados se encuentra un estudio en pacientes con diabetes en los que a pesar de tener niveles elevados de sCD40L (similares a los de nuestro grupo con EB) presentaban un grado de activación plaquetaria similar a los sujetos del grupo control [158].

En nuestra cohorte de pacientes con EB, el aumento de la liberación de sCD40L de las plaquetas podría depender de su mayor contenido endógeno de CD40L y de MMP-9. El sCD40L es un potente activador de la respuesta inflamatoria y se ha asociado a la MMP-9 en patologías que cursan con daño tisular, como la fibrilación auricular y el infarto agudo de miocardio [340, 341]. Los altos niveles plasmáticos de sCD40L en pacientes con EB pueden ser responsables de la respuesta inflamatoria observada en estos pacientes, incluso cuando existen opiniones contradictorias acerca de si sólo el CD40L asociado a la membrana plasmática es capaz de inducir una reacción inflamatoria en las células endoteliales [146, 342].

Hasta donde sabemos, el presente estudio es el primero en demostrar que las plaquetas de los pacientes con EB expresan niveles altos de CD40L y liberan niveles plasmáticos elevados de sCD40L. En la EB se ha descrito un aumento en el porcentaje de linfocitos que expresan CD40L. Sin embargo su participación en la patogénesis de la enfermedad se ha descartado por el bajo nivel de estos linfocitos en sangre periférica [343, 344].

La interacción CD40/CD40L está involucrada en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y es crucial para la interacción celular heterotípica. Por este motivo analizamos los agregados formados por plaquetas y leucocitos (APL) en pacientes con EB. Tanto en condiciones basales como tras la estimulación con TRAP y ADP, no encontramos diferencias en la cantidad de APL de pacientes y controles, posiblemente debido a que las plaquetas en nuestro grupo de

pacientes no son hiperreactivas. Un estudio reciente demuestra que las plaquetas deficientes en CD40L forman menos APL [157], sin embargo nosotros observamos que la utilización de anticuerpos bloqueantes dirigidos contra el CD40 y el CD40L no fueron capaces de modificar la formación de APL en nuestro grupo de pacientes.

La desregulación de la vía CD40L/CD40 suele aparecer en enfermedades inflamatorias o autoinmunes. Por este motivo el sistema CD40/CD40L constituye una diana terapéutica muy interesante y varios anticuerpos anti-CD40L y anti-CD40 con diversos efectos biológicos se encuentran en fase de desarrollo clínico para su aplicación en el tratamiento del cáncer y de algunas enfermedades autoinmunes [345]. Sin embargo, ciertos ensayos clínicos realizados para evaluar el efecto terapéutico de dos anticuerpos monoclonales humanizados anti-CD40L en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, mostraron una alta incidencia de complicaciones tromboembólicas, incluso cuando estos fármacos parecían ser potencialmente eficaces [346].

6.3.3 Sistema de retroalimentación positiva entre la MMP-9 y el sCD40L

Un estudio realizado en pacientes con la enfermedad de Crohn, una patología que cursa con niveles elevados de sCD40L y MMP-9 en el plasma, mostró que la MMP-9 podría estar involucrada en la liberación del sCD40L de las plaquetas [160]. Estos resultados son similares a los que hemos obtenido en el presente estudio. El sCD40L aumenta la expresión de la MMP-9 en diferentes tipos celulares tales como células endoteliales, células musculares lisas vasculares, neutrófilos, y células neoplásicas como las células del carcinoma cervical y del osteosarcoma [347-351]. En el caso de las plaquetas, la regulación del contenido de la MMP-9 puede ocurrir durante la megacariopoyesis. Dado que por razones éticas no se pueden realizar experimentos en los megacariocitos de los pacientes con EB y que hasta la fecha no se dispone de un modelo animal adecuado de la EB para estudiar este proceso de regulación [352], hemos elegido la línea celular megacarioblástica MEG-01 como modelo experimental para evaluar el efecto del sCD40L en los niveles de MMP-9 de origen plaquetario.

En estudios previos, Hermann *et al.* demostraron que el PMA (Forbol 12-Miristato 13-Acetato) producía un aumento sostenido en el tiempo de la expresión de CD40L en la superficie de las células MEG-01 [128]. Por el contrario, nuestros experimentos en estas

células mostraron que la expresión en la superficie celular de CD40L alcanzaba su punto máximo 5 minutos después de la estimulación con TRAP 100 μ M y disminuía con el transcurso del tiempo. Esta diferencia puede explicarse porque en el estudio de Hermann las células MEG-01 se incubaron con PMA durante mucho tiempo, lo que indujo su diferenciación a megacariocitos, mientras que en nuestro estudio la estimulación con TRAP fue más corta, y aunque pudo activar el receptor de fibrinógeno, no tuvo efecto sobre la maduración de las MEG-01. La similitud entre las células MEG-01 y los megacariocitos es apoyada por el hecho de que los megacariocitos expresan ARN mensajero y muestran actividad de la MMP-9 [353].

En nuestro estudio hemos demostrado la implicación de la vía del CD40/CD40L en el aumento del contenido de la MMP-9 en las células MEG-01 ya que el bloqueo del CD40 o del CD40L inhibió el aumento de la actividad de MMP-9 inducido por el sCD40L en estas células. Este comportamiento es apoyado por otros estudios donde se ha comprobado que los macrófagos deficientes en CD40 muestran una actividad gelatinolítica reducida [354] y que el trapidil, un inhibidor de la expresión de CD40 inducida por IFN- α , suprime la expresión *in vitro* de MMPs en el aneurisma aórtico abdominal [355-357]. El aumento en los niveles de MMP-9 y sCD40L de origen plaquetario es compatible con un bucle de retroalimentación positivo que contribuye al estado inflamatorio en los pacientes con EB.

7. Conclusiones

- 7.1 La Tromboelastometría Rotacional (ROTEM®) y la Trombinografía Automática Calibrada (CAT) demuestran que en la EB existe un estado hipercoagulable incluso en ausencia de trombosis.
- 7.2 En los pacientes con EB existe una relación entre la velocidad de formación y fortaleza del coágulo y la actividad de la enfermedad. Sin embargo, el incremento en la generación de trombina es independiente de la actividad de la enfermedad.
- 7.3 En los pacientes con EB, el aumento en los niveles plasmáticos de PAI-1 y fibrinógeno contribuyen a la presencia del estado protrombótico.
- 7.4 La determinación de los niveles de TAT y dímero-d no son parámetros adecuados para evaluar el estado hipercoagulable de la EB en ausencia de trombosis.
- 7.5 En la EB existe un daño o activación del endotelio que se relaciona con el aumento de la actividad de la enfermedad y la presencia de un estado protrombótico.
- 7.6 En la EB existe un aumento en el contenido y la liberación plaquetaria de MMP-9 y CD40L.
- 7.7 Las plaquetas y los megacariocitos podrían contribuir al estado inflamatorio de la EB a través de un mecanismo de retroalimentación positivo mediado por el sCD40L y la MMP-9.

8. Referencias bibliográficas

1. O'Duffy, J.D., *Behcet's disease*. Curr Opin Rheumatol, 1994. **6**(1): p. 39-43.
2. Kitchen, S., et al., *New developments in laboratory diagnosis and monitoring*. Haemophilia, 2010. **16 Suppl 5**: p. 61-6.
3. UStün, C., *A famous Turkish dermatologist, Dr. Hulusi Behcet*. Eur J Dermatol, 2002. **12**(5): p. 469-70.
4. Behcet, H. and E.L. Matteson, *On relapsing, aphthous ulcers of the mouth, eye and genitalia caused by a virus*. 1937. Clin Exp Rheumatol, 2010. **28**(4 Suppl 60): p. S2-5.
5. Mendes, D., et al., *Behcet's disease--a contemporary review*. J Autoimmun, 2009. **32**(3-4): p. 178-88.
6. *Criteria for diagnosis of Behcet's disease*. International Study Group for Behcet's Disease. Lancet, 1990. **335**(8697): p. 1078-80.
7. Davatchi, F., *Diagnosis/Classification Criteria for Behcet's Disease*. Patholog Res Int, 2012. **2012**: p. 607921.
8. Eldem, B., C. Onur, and S. Ozen, *Clinical features of pediatric Behcet's disease*. J Pediatr Ophthalmol Strabismus, 1998. **35**(3): p. 159-61.
9. Kone-Paut, I., et al., *Clinical features of Behcet's disease in children: an international collaborative study of 86 cases*. J Pediatr, 1998. **132**(4): p. 721-5.
10. Onder, M. and M.A. Gurer, *The multiple faces of Behcet's disease and its aetiological factors*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2001. **15**(2): p. 126-36.
11. Azizlerli, G., et al., *Prevalence of Behcet's disease in Istanbul, Turkey*. Int J Dermatol, 2003. **42**(10): p. 803-6.
12. Penafiel Burkhardt, R., et al., *[Behcet's disease in Spain]*. Med Clin (Barc), 2007. **128**(18): p. 717.
13. Eiroa, P., et al., *Estudio epidemiológico de la enfermedad de Behçet en el área Sanitaria de La Coruña*. Rev Esp Reumatol, 1991. **18**: p. 285-7.
14. Gonzalez-Gay, M.A., et al., *Epidemiologic and clinical aspects of Behcet's disease in a defined area of Northwestern Spain, 1988-1997*. J Rheumatol, 2000. **27**(3): p. 703-7.
15. Isogai, E., et al., *Chemiluminescence of neutrophils from patients with Behcet's disease and its correlation with an increased proportion of uncommon serotypes of Streptococcus sanguis in the oral flora*. Arch Oral Biol, 1990. **35**(1): p. 43-8.
16. Yokota, K., et al., *Characterization of Streptococcus sanguis isolated from patients with Behcet's disease*. Microbiol Immunol, 1995. **39**(9): p. 729-32.
17. Mizushima, Y., (The Behçet's Disease Research Committee of Japan), *Skin hypersensitivity to streptococcal antigens and the induction of systemic symptoms by the antigens in Behcet's disease--a multicenter study*. The Behcet's Disease Research Committee of Japan. J Rheumatol, 1989. **16**(4): p. 506-11.
18. Sakane, T., et al., *Behcet's disease*. N Engl J Med, 1999. **341**(17): p. 1284-91.
19. Mumcu, G., et al., *The role of infectious agents in the pathogenesis, clinical manifestations and treatment strategies in Behcet's disease*. Clin Exp Rheumatol, 2007. **25**(4 Suppl 45): p. S27-33.
20. Calguneri, M., et al., *Effect of prophylactic benzathine penicillin on mucocutaneous symptoms of Behcet's disease*. Dermatology, 1996. **192**(2): p. 125-8.
21. Calguneri, M., et al., *The effect of prophylactic penicillin treatment on the course of arthritis episodes in patients with Behcet's disease. A randomized clinical trial*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(12): p. 2062-5.
22. Cheon, J., Çelik, A.F., Kim, W.H., *Behçet's disease: Gastrointestinal involvement*. In: Yazici Y, Yazici H, editors. Behçet's syndrome. New York: Springer, 2010: p. p. 165-89.
23. Hamza, M., et al., *Antibodies to herpes simplex virus in patients with Behcet's disease*. Clin Rheumatol, 1990. **9**(4): p. 498-500.

24. Hamzaoui, K., et al., *Natural killer cell activity, interferon-gamma and antibodies to herpes viruses in patients with Behcet's disease*. Clin Exp Immunol, 1990. **79**(1): p. 28-34.
25. Studd, M., D.J. McCance, and T. Lehner, *Detection of HSV-1 DNA in patients with Behcet's syndrome and in patients with recurrent oral ulcers by the polymerase chain reaction*. J Med Microbiol, 1991. **34**(1): p. 39-43.
26. Lee, S., et al., *Polymerase chain reaction reveals herpes simplex virus DNA in saliva of patients with Behcet's disease*. Arch Dermatol Res, 1996. **288**(4): p. 179-83.
27. Nomura, Y., et al., *Use of the highly sensitive PCR method to detect the Herpes simplex virus type 1 genome and its expression in samples from Behcet disease patients*. J Med Dent Sci, 1998. **45**(1): p. 51-8.
28. Sohn, S., et al., *Behcet's disease-like symptoms induced by the Herpes simplex virus in ICR mice*. Eur J Dermatol, 1998. **8**(1): p. 21-3.
29. Sohn, S., et al., *Experimental studies on the antiviral agent famciclovir in Behcet's disease symptoms in ICR mice*. Br J Dermatol, 2001. **145**(5): p. 799-804.
30. Bonnet, M., D. Ouzan, and C. Trepo, *[Plasma exchange and acyclovir in Behcet's disease]*. J Fr Ophtalmol, 1986. **9**(1): p. 15-22.
31. Davies, U.M., R.G. Palmer, and A.M. Denman, *Treatment with acyclovir does not affect orogenital ulcers in Behcet's syndrome: a randomized double-blind trial*. Br J Rheumatol, 1988. **27**(4): p. 300-2.
32. Fowler, T.J., et al., *Behcet's syndrome with neurological manifestations in two sisters*. Br Med J, 1968. **2**(5603): p. 473-4.
33. Goolamali, S.K., et al., *Familial Behcet's syndrome*. Br J Dermatol, 1976. **95**(6): p. 637-42.
34. Nahir, M., et al., *HL-A antigens in Behcet's disease. A family study*. Dermatologica, 1978. **156**(4): p. 205-8.
35. Abdel-Aziz, A.H. and E.A. Fairburn, *Familial Behcet's syndrome*. Cutis, 1978. **21**(5): p. 649-52.
36. Dundar, S.V., U. Gencalp, and H. Simsek, *Familial cases of Behcet's disease*. Br J Dermatol, 1985. **113**(3): p. 319-21.
37. Fietta, P., *Behcet's disease: familial clustering and immunogenetics*. Clin Exp Rheumatol, 2005. **23**(4 Suppl 38): p. S96-105.
38. Altenburg, A., et al., *[Epidemiology and clinical manifestations of Adamantiades-Behcet disease in Germany -- current pathogenetic concepts and therapeutic possibilities]*. J Dtsch Dermatol Ges, 2006. **4**(1): p. 49-64; quiz 65-6.
39. Alpsoy, E., C.C. Zouboulis, and G.E. Ehrlich, *Mucocutaneous lesions of Behcet's disease*. Yonsei Med J, 2007. **48**(4): p. 573-85.
40. Ohno, S., et al., *Close association of HLA-Bw51 with Behcet's disease*. Arch Ophthalmol, 1982. **100**(9): p. 1455-8.
41. Zouboulis, C.C. and T. May, *Pathogenesis of Adamantiades-Behcet's disease*. Adv Exp Med Biol, 2003. **528**: p. 161-71.
42. Maldini, C., et al., *Relationships of HLA-B51 or B5 genotype with Behcet's disease clinical characteristics: systematic review and meta-analyses of observational studies*. Rheumatology (Oxford), 2012. **51**(5): p. 887-900.
43. Kang, E.H., et al., *Genetic and non-genetic factors affecting the visual outcome of ocular Behcet's disease*. Hum Immunol, 2013.
44. Chajek-Shaul, T., et al., *HLA-B51 may serve as an immunogenetic marker for a subgroup of patients with Behcet's syndrome*. Am J Med, 1987. **83**(4): p. 666-72.
45. Akpolat, T., et al., *Familial Behcet's disease*. Eur J Med, 1992. **1**(7): p. 391-5.

46. Hayasaka, S., H. Kurome, and S. Noda, *HLA antigens in a Japanese family with Behcet's disease*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1994. **232**(10): p. 589-90.
47. Touma, Z., et al., *TNF polymorphisms in patients with Behcet disease: a meta-analysis*. Arch Med Res, 2010. **41**(2): p. 142-6.
48. Atagunduz, P., T. Ergun, and H. Direskeneli, *MEFV mutations are increased in Behcet's disease (BD) and are associated with vascular involvement*. Clin Exp Rheumatol, 2003. **21**(4 Suppl 30): p. S35-7.
49. Imirzalioglu, N., et al., *MEFV gene is a probable susceptibility gene for Behcet's disease*. Scand J Rheumatol, 2005. **34**(1): p. 56-8.
50. Tasliyurt, T., et al., *Common MEFV gene mutations in Turkish patients with Behcet's disease*. Gene, 2013. **530**(1): p. 100-3.
51. Ayesh, S., et al., *Molecular analysis of MEFV gene mutations among Palestinian patients with Behcet's disease*. Scand J Rheumatol, 2008. **37**(5): p. 370-4.
52. Verity, D.H., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms in Behcet's disease*. Eur J Immunogenet, 2000. **27**(2): p. 73-6.
53. Boiardi, L., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms in Behcet's Disease*. J Rheumatol, 2001. **28**(6): p. 1283-7.
54. Kim, E.H., et al., *The ICAM1469*E is associated with susceptibility to ocular lesions and vasculitis in Korean patients with Behcet's disease*. Adv Exp Med Biol, 2003. **528**: p. 235-6.
55. Chmaisse, H.N., et al., *The ICAM-1 469 T/C gene polymorphism but not 241 G/A is associated with Behcets disease in the Lebanese population*. Saudi Med J, 2006. **27**(5): p. 604-7.
56. Ben Dhifallah, I., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with Behcet's disease in Tunisian population*. Hum Immunol, 2008. **69**(10): p. 661-5.
57. Karasneh, J.A., et al., *Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene are associated with Behcet's disease*. Rheumatology (Oxford), 2005. **44**(5): p. 614-7.
58. Kim, J.U., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(11): p. 1083-7.
59. Oksel, F., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism is associated with Behcet's disease*. Clin Exp Rheumatol, 2006. **24**(5 Suppl 42): p. S79-82.
60. Salvarani, C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease*. J Rheumatol, 2002. **29**(3): p. 535-40.
61. Pay, S., et al., *Immunopathogenesis of Behcet's disease with special emphasize on the possible role of antigen presenting cells*. Rheumatol Int, 2007. **27**(5): p. 417-24.
62. Bank, I., M. Duvdevani, and A. Livneh, *Expansion of gammadelta T-cells in Behcet's disease: role of disease activity and microbial flora in oral ulcers*. J Lab Clin Med, 2003. **141**(1): p. 33-40.
63. Su, D., et al., *Roles of gammadelta T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 985753.
64. Zierhut, M., et al., *Immunology and functional genomics of Behcet's disease*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(9): p. 1903-22.
65. Gurler, A., A. Boyvat, and U. Tursen, *Clinical manifestations of Behcet's disease: an analysis of 2147 patients*. Yonsei Med J, 1997. **38**(6): p. 423-7.
66. Accardo-Palumbo, A., et al., *Polymorphonuclear leukocyte myeloperoxidase levels in patients with Behcet's disease*. Clin Exp Rheumatol, 2000. **18**(4): p. 495-8.
67. Verity, D.H., et al., *Behcet's disease: from Hippocrates to the third millennium*. Br J Ophthalmol, 2003. **87**(9): p. 1175-83.

68. Haznedaroglu, I.C., et al., *Haemostasis, thrombosis, and endothelium in Behcet's disease*. Acta Haematol, 1998. **99**(4): p. 236-7.
69. Hampton, K.K., et al., *Coagulation and fibrinolytic activity in Behcet's disease*. Thromb Haemost, 1991. **66**(3): p. 292-4.
70. Koc, Y., et al., *Vascular involvement in Behcet's disease*. J Rheumatol, 1992. **19**(3): p. 402-10.
71. Bayraktar, Y., E. Ozaslan, and D.H. Van Thiel, *Gastrointestinal manifestations of Behcet's disease*. J Clin Gastroenterol, 2000. **30**(2): p. 144-54.
72. Harper, C.M., Jr., et al., *Intracranial hypertension in Behcet's disease: demonstration of sinus occlusion with use of digital subtraction angiography*. Mayo Clin Proc, 1985. **60**(6): p. 419-22.
73. Lakhanpal, S., et al., *Pathologic features of Behcet's syndrome: a review of Japanese autopsy registry data*. Hum Pathol, 1985. **16**(8): p. 790-5.
74. Chamorro, A.J., et al., *Association of allelic variants of factor V Leiden, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase with thrombosis or ocular involvement in Behcet's disease: a systematic review and meta-analysis*. Autoimmun Rev, 2013. **12**(5): p. 607-16.
75. Guermazi, S., M. Hamza, and K. Dellagi, *Protein S deficiency and antibodies to protein S in patients with Behcet's disease*. Thromb Res, 1997. **86**(3): p. 197-204.
76. Mader, R., et al., *Thrombophilic factors and their relation to thromboembolic and other clinical manifestations in Behcet's disease*. J Rheumatol, 1999. **26**(11): p. 2404-8.
77. Nalcaci, M. and Y. Pekcelen, *Antithrombin III, protein C and protein S plasma levels in patients with Behcet's disease*. J Int Med Res, 1998. **26**(4): p. 206-8.
78. Lenk, N., et al., *Protein C and protein S activities in Behcet's disease as risk factors of thrombosis*. Int J Dermatol, 1998. **37**(2): p. 124-5.
79. Sengul, N., et al., *Comparison of coagulation parameters for healthy subjects and Behcet disease patients with and without vascular involvement*. World J Surg, 2000. **24**(12): p. 1584-8.
80. Haznedaroglu, I.C., et al., *Haemostatic markers of procoagulant imbalance in Behcet's disease*. Eur J Haematol, 1996. **57**(1): p. 107-8.
81. Espinosa, G., et al., *Vascular involvement in Behcet's disease: relation with thrombophilic factors, coagulation activation, and thrombomodulin*. Am J Med, 2002. **112**(1): p. 37-43.
82. Haznedaroglu, I.C., et al., *Impaired haemostatic kinetics and endothelial function in Behcet's disease*. J Intern Med, 1996. **240**(4): p. 181-7.
83. Fusegawa, H., et al., *[Blood coagulation and fibrinolysis in patients with Behcet's disease]*. Rinsho Byori, 1991. **39**(5): p. 509-16.
84. Ozoran, K., et al., *Plasma von Willebrand factor, tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor, and antithrombin III levels in Behcet's disease*. Scand J Rheumatol, 1995. **24**(6): p. 376-82.
85. Kayikcioglu, M., et al., *Endothelial functions in Behcet's disease*. Rheumatol Int, 2006. **26**(4): p. 304-8.
86. Ates, A., et al., *Serum homocysteine level is higher in Behcet's disease with vascular involvement*. Rheumatol Int, 2005. **25**(1): p. 42-4.
87. Ricart, J.M., et al., *Thrombophilic risk factors and homocysteine levels in Behcet's disease in eastern Spain and their association with thrombotic events*. Thromb Haemost, 2006. **95**(4): p. 618-24.
88. Feki, M., et al., *Hyperhomocysteinaemia is associated with uveitis but not with deep venous thrombosis in Behcet's disease*. Clin Chem Lab Med, 2004. **42**(12): p. 1417-23.

89. Chambers, J.C., D.O. Haskard, and J.S. Kooner, *Vascular endothelial function and oxidative stress mechanisms in patients with Behcet's syndrome*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(2): p. 517-20.
90. Kosar, A., et al., *Effects of interferon-alpha2a treatment on serum levels of tumor necrosis factor-alpha, tumor necrosis factor-alpha2 receptor, interleukin-2, interleukin-2 receptor, and E-selectin in Behcet's disease*. Rheumatol Int, 1999. **19**(1-2): p. 11-4.
91. Haznedaroglu, E., et al., *Selectin adhesion molecules in Behcet's disease*. Ann Rheum Dis, 2000. **59**(1): p. 61-3.
92. Karakuzu, A., A. Aktas, and F. Akcay, *Serum E-selectin and beta 2-microglobulin levels in Behcet's disease*. J Int Med Res, 2002. **30**(1): p. 85-8.
93. Sari, R.A., et al., *Levels of soluble E-selectin in patients with active Behcet's disease*. Clin Rheumatol, 2005. **24**(1): p. 55-9.
94. Caliskan, M., et al., *Endothelial functions are more severely impaired during active disease period in patients with Behcet's disease*. Clin Rheumatol, 2007. **26**(7): p. 1074-8.
95. Direskeneli, H., et al., *Anti-endothelial cell antibodies, endothelial proliferation and von Willebrand factor antigen in Behcet's disease*. Clin Rheumatol, 1995. **14**(1): p. 55-61.
96. Briani, C., et al., *Increased titres of IgM anti-heparan sulfate antibody in Behcet's disease*. Clin Exp Rheumatol, 2006. **24**(5 Suppl 42): p. S104-7.
97. Triolo, G., et al., *Enhancement of endothelial cell E-selectin expression by sera from patients with active Behcet's disease: moderate correlation with anti-endothelial cell antibodies and serum myeloperoxidase levels*. Clin Immunol, 1999. **91**(3): p. 330-7.
98. Sandikci, R., et al., *Lipid peroxidation and antioxidant defence system in patients with active or inactive Behcet's disease*. Acta Derm Venereol, 2003. **83**(5): p. 342-6.
99. Sahin, M., et al., *Asymmetric dimethylarginine and nitric oxide levels as signs of endothelial dysfunction in Behcet's disease*. Ann Clin Lab Sci, 2006. **36**(4): p. 449-54.
100. Boger, R.H., *The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(4): p. 824-33.
101. Fliser, D., et al., *Asymmetric dimethylarginine: a cardiovascular risk factor in renal disease?* Kidney Int Suppl, 2003(84): p. S37-40.
102. Lee, Y.J., et al., *Coagulation parameters and plasma total homocysteine levels in Behcet's disease*. Thromb Res, 2002. **106**(1): p. 19-24.
103. Okka, M., et al., *Plasma homocysteine level and uveitis in Behcet's disease*. Isr Med Assoc J, 2002. **4**(11 Suppl): p. 931-4.
104. Ozdemir, R., et al., *Vascular endothelial function and plasma homocysteine levels in Behcet's disease*. Am J Cardiol, 2004. **94**(4): p. 522-5.
105. Akar, S., et al., *Circulated activated platelets and increased platelet reactivity in patients with Behcet's disease*. Clin Appl Thromb Hemost, 2006. **12**(4): p. 451-7.
106. Martinez, M., et al., *Platelet activation and red blood cell phosphatidylserine exposure evaluated by flow cytometry in patients with Behcet's disease: are they related to thrombotic events?* Pathophysiol Haemost Thromb, 2007. **36**(1): p. 18-22.
107. Yazici, H., et al., *Influence of age of onset and patient's sex on the prevalence and severity of manifestations of Behcet's syndrome*. Ann Rheum Dis, 1984. **43**(6): p. 783-9.
108. Alpsoy, E., et al., *Clinical features and natural course of Behcet's disease in 661 cases: a multicentre study*. Br J Dermatol, 2007. **157**(5): p. 901-6.
109. McCarty, M.A., R.A. Garton, and J.L. Jorizzo, *Complex aphthosis and Behcet's disease*. Dermatol Clin, 2003. **21**(1): p. 41-8, vi.
110. Malik, G.H., I.A. Sirwal, and K.A. Pandit, *Behcet's syndrome associated with minimal change glomerulonephritis and renal vein thrombosis*. Nephron, 1989. **52**(1): p. 87-9.

111. Schiff, S., et al., *Acute myocardial infarction and recurrent ventricular arrhythmias in Behcet's syndrome*. Am Heart J, 1982. **103**(3): p. 438-40.
112. Yazici, H., et al., *A comparative study of the pathergy reaction among Turkish and British patients with Behcet's disease*. Ann Rheum Dis, 1984. **43**(1): p. 74-5.
113. Hatemi, G. and H. Yazici, *Behcet's syndrome and micro-organisms*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2011. **25**(3): p. 389-406.
114. Akman-Demir, G., P. Serdaroglu, and B. Tasci, *Clinical patterns of neurological involvement in Behcet's disease: evaluation of 200 patients. The Neuro-Behcet Study Group*. Brain, 1999. **122** (Pt 11): p. 2171-82.
115. Lie, J.T., *Vascular involvement in Behcet's disease: arterial and venous and vessels of all sizes*. J Rheumatol, 1992. **19**(3): p. 341-3.
116. Kural-Seyahi, E., et al., *The long-term mortality and morbidity of Behcet syndrome: a 2-decade outcome survey of 387 patients followed at a dedicated center*. Medicine (Baltimore), 2003. **82**(1): p. 60-76.
117. Mat, C., et al., *A double-blind trial of depot corticosteroids in Behcet's syndrome*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(3): p. 348-52.
118. Hatemi, G., et al., *EULAR recommendations for the management of Behcet disease*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(12): p. 1656-62.
119. Masuda, K., et al., *Double-masked trial of cyclosporin versus colchicine and long-term open study of cyclosporin in Behcet's disease*. Lancet, 1989. **1**(8647): p. 1093-6.
120. Yazici, H., et al., *A controlled trial of azathioprine in Behcet's syndrome*. N Engl J Med, 1990. **322**(5): p. 281-5.
121. Sorensen, B., et al., *Evaluation of coagulation kinetics using thromboelastometry-methodologic influence of activator and test medium*. Ann Hematol, 2010. **89**(11): p. 1155-61.
122. Stanford, M.R., et al., *Heat shock protein peptides reactive in patients with Behcet's disease are uveitogenic in Lewis rats*. Clin Exp Immunol, 1994. **97**(2): p. 226-31.
123. Ergun, T., et al., *Histopathologic features of the spontaneous pustular lesions of Behcet's syndrome*. Int J Dermatol, 1998. **37**(3): p. 194-6.
124. Ricart, J.M., et al., *[Behcet disease: study of 74 patients]*. Med Clin (Barc), 2006. **127**(13): p. 496-9.
125. Schonbeck, U. and P. Libby, *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(1): p. 4-43.
126. Gauchat, J.F., et al., *CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils*. Eur J Immunol, 1995. **25**(3): p. 863-5.
127. Gauchat, J.F., et al., *Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils*. Nature, 1993. **365**(6444): p. 340-3.
128. Hermann, A., et al., *Platelet CD40 ligand (CD40L)--subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel*. Platelets, 2001. **12**(2): p. 74-82.
129. Kroccek, R.A., et al., *Defective expression of CD40 ligand on T cells causes "X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (HIGM1)"*. Immunol Rev, 1994. **138**: p. 39-59.
130. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
131. Ren, C.L., et al., *Signal transduction via CD40 involves activation of lyn kinase and phosphatidylinositol-3-kinase, and phosphorylation of phospholipase C gamma 2*. J Exp Med, 1994. **179**(2): p. 673-80.
132. Li, Y.Y., et al., *CD40 ligation results in protein kinase C-independent activation of ERK and JNK in resting murine splenic B cells*. J Immunol, 1996. **157**(4): p. 1440-7.
133. Sakata, N., et al., *Selective activation of c-Jun kinase mitogen-activated protein kinase by CD40 on human B cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(51): p. 30823-8.

134. Sutherland, C.L., et al., *Differential activation of the ERK, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinases by CD40 and the B cell antigen receptor*. J Immunol, 1996. **157**(8): p. 3381-90.
135. Cheng, G., et al., *Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1494-8.
136. Grammer, A.C. and P.E. Lipsky, *CD40-mediated regulation of immune responses by TRAF-dependent and TRAF-independent signaling mechanisms*. Adv Immunol, 2000. **76**: p. 61-178.
137. Grammer, A.C., et al., *TNF receptor-associated factor-3 signaling mediates activation of p38 and Jun N-terminal kinase, cytokine secretion, and Ig production following ligation of CD40 on human B cells*. J Immunol, 1998. **161**(3): p. 1183-93.
138. Ishida, T., et al., *Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 28745-8.
139. Ishida, T.K., et al., *TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9437-42.
140. Lee, S.Y., et al., *TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival*. Immunity, 1997. **7**(5): p. 703-13.
141. Rothe, M., et al., *TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40*. Science, 1995. **269**(5229): p. 1424-7.
142. Pietravalle, F., et al., *Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes*. J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 5965-7.
143. Andre, P., et al., *Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease*. Circulation, 2002. **106**(8): p. 896-9.
144. Delmas, Y., et al., *[Platelet-associated CD154: a new interface in haemostasis and in the inflammatory reaction]*. Med Sci (Paris), 2005. **21**(10): p. 825-31.
145. Danese, S., et al., *Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients*. Gut, 2003. **52**(10): p. 1435-41.
146. Henn, V., et al., *The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40*. Blood, 2001. **98**(4): p. 1047-54.
147. Jin, Y., et al., *Characterization of soluble CD40 ligand released from human activated platelets*. J Med Dent Sci, 2001. **48**(1): p. 23-7.
148. Furman, M.I., et al., *Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glycoprotein IIb/IIIa and actin polymerization*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(12): p. 2319-25.
149. Nannizzi-Alaimo, L., V.L. Alves, and D.R. Phillips, *Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation*. Circulation, 2003. **107**(8): p. 1123-8.
150. Choi, W.S., O.H. Jeon, and D.S. Kim, *CD40 ligand shedding is regulated by interaction between matrix metalloproteinase-2 and platelet integrin alpha(IIb)beta(3)*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(6): p. 1364-71.
151. Reinboldt, S., et al., *Preliminary evidence for a matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)-dependent shedding of soluble CD40 ligand (sCD40L) from activated platelets*. Platelets, 2009. **20**(6): p. 441-4.
152. Yellin, M.J., et al., *Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(2): p. 209-16.

153. Thienel, U., J. Loike, and M.J. Yellin, *CD154 (CD40L) induces human endothelial cell chemokine production and migration of leukocyte subsets*. Cell Immunol, 1999. **198**(2): p. 87-95.
154. Melter, M., et al., *Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3801-8.
155. Cho, C.S., et al., *CD40 engagement on synovial fibroblast up-regulates production of vascular endothelial growth factor*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 5055-61.
156. Tarandovskiy, I.D., et al., *Investigation of the phenotype heterogeneity in severe hemophilia A using thromboelastography, thrombin generation, and thrombodynamics*. Thromb Res, 2013. **131**(6): p. e274-80.
157. Lievens, D., et al., *Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis*. Blood, 2010. **116**(20): p. 4317-27.
158. Varo, N., et al., *Elevated release of sCD40L from platelets of diabetic patients by thrombin, glucose and advanced glycation end products*. Diab Vasc Dis Res, 2005. **2**(2): p. 81-7.
159. Kato, K., et al., *The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus*. J Clin Invest, 1999. **104**(7): p. 947-55.
160. Menchen, L., et al., *Matrix metalloproteinase 9 is involved in Crohn's disease-associated platelet hyperactivation through the release of soluble CD40 ligand*. Gut, 2009. **58**(7): p. 920-8.
161. Chen, D., et al., *MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 gene polymorphisms in Chinese patients with generalized aggressive periodontitis*. J Clin Periodontol, 2007. **34**(5): p. 384-9.
162. Manicone, A.M. and J.K. McGuire, *Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(1): p. 34-41.
163. Butler, G.S. and C.M. Overall, *Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new "intracellular" substrates revealed by degradomics*. Biochemistry, 2009. **48**(46): p. 10830-45.
164. Garg, P., et al., *Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **296**(2): p. G175-84.
165. Zhou, T.B. and S.S. Yin, *Association of matrix metalloproteinase-9 level with the risk of renal involvement for Henoch-Schonlein purpura in children*. Ren Fail, 2013. **35**(3): p. 425-9.
166. Segarra, M., et al., *Gelatinase expression and proteolytic activity in giant-cell arteritis*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(11): p. 1429-35.
167. Pay, S., et al., *Serum MMP-2 and MMP-9 in patients with Behcet's disease: do their higher levels correlate to vasculo-Behcet's disease associated with aneurysm formation?* Clin Exp Rheumatol, 2007. **25**(4 Suppl 45): p. S70-5.
168. Park, M.S., et al., *Quantification of hypercoagulable state after blunt trauma: Microparticle and thrombin generation are increased relative to injury severity, while standard markers are not*. Surgery, 2012. **151**(6): p. 831-6.
169. McEver, R.P., *Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation*. Thromb Haemost, 2001. **86**(3): p. 746-56.
170. Bonfanti, R., et al., *PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells*. Blood, 1989. **73**(5): p. 1109-12.
171. McEver, R.P., et al., *GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies*. J Clin Invest, 1989. **84**(1): p. 92-9.

172. Moore, K.L., *Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1*. Leuk Lymphoma, 1998. **29**(1-2): p. 1-15.
173. Frenette, P.S., et al., *P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo*. J Exp Med, 2000. **191**(8): p. 1413-22.
174. Frenette, P.S., et al., *Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7450-4.
175. Romo, G.M., et al., *The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin*. J Exp Med, 1999. **190**(6): p. 803-14.
176. Chong, B.H., et al., *Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders*. Blood, 1994. **83**(6): p. 1535-41.
177. Katayama, M., et al., *Soluble P-selectin is present in normal circulation and its plasma level is elevated in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome*. Br J Haematol, 1993. **84**(4): p. 702-10.
178. Kappelmayer, J., et al., *The emerging value of P-selectin as a disease marker*. Clin Chem Lab Med, 2004. **42**(5): p. 475-86.
179. Ridker, P.M., J.E. Buring, and N. Rifai, *Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events*. Circulation, 2001. **103**(4): p. 491-5.
180. Celi, A., et al., *P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 8767-71.
181. Andre, P., et al., *Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13835-40.
182. Hrachovinova, I., et al., *Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A*. Nat Med, 2003. **9**(8): p. 1020-5.
183. Falati, S., et al., *Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin*. J Exp Med, 2003. **197**(11): p. 1585-98.
184. Turkoz, Y., et al., *Serum levels of soluble P-selectin are increased and associated with disease activity in patients with Behcet's syndrome*. Mediators Inflamm, 2005. **2005**(4): p. 237-41.
185. Tunc, S.E., et al., *Platelet-activating factor and P-selectin activities in thrombotic and nonthrombotic Behcet's patients*. Rheumatol Int, 2005. **25**(5): p. 326-31.
186. Keelan, E.T., et al., *Characterization of E-selectin expression in vivo with use of a radiolabeled monoclonal antibody*. Am J Physiol, 1994. **266**(1 Pt 2): p. H278-90.
187. Roche, W.R., et al., *Cell adhesion molecules and the bronchial epithelium*. Am Rev Respir Dis, 1993. **148**(6 Pt 2): p. S79-82.
188. Schweitzer, K.M., et al., *Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues*. Am J Pathol, 1996. **148**(1): p. 165-75.
189. McIntyre, T.M., et al., *Molecular mechanisms of early inflammation*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 302-5.
190. Wyble, C.W., et al., *TNF-alpha and IL-1 upregulate membrane-bound and soluble E-selectin through a common pathway*. J Surg Res, 1997. **73**(2): p. 107-12.
191. Haraldsen, G., et al., *Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells*. J Immunol, 1996. **156**(7): p. 2558-65.
192. Bevilacqua, M.P., et al., *Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins*. Science, 1989. **243**(4895): p. 1160-5.

193. Ferri, C., et al., *Clustering of endothelial markers of vascular damage in human salt-sensitive hypertension: influence of dietary sodium load and depletion*. Hypertension, 1998. **32**(5): p. 862-8.
194. Hwang, S.J., et al., *Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study*. Circulation, 1997. **96**(12): p. 4219-25.
195. Bannan, S., M.W. Mansfield, and P.J. Grant, *Soluble vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin levels in relation to vascular risk factors and to E-selectin genotype in the first degree relatives of NIDDM patients and in NIDDM patients*. Diabetologia, 1998. **41**(4): p. 460-6.
196. Cominacini, L., et al., *Elevated levels of soluble E-selectin in patients with IDDM and NIDDM: relation to metabolic control*. Diabetologia, 1995. **38**(9): p. 1122-4.
197. Fasching, P., W. Waldhausl, and O.F. Wagner, *Elevated circulating adhesion molecules in NIDDM--potential mediators in diabetic macroangiopathy*. Diabetologia, 1996. **39**(10): p. 1242-4.
198. Smulders, R.A., et al., *Distinct associations of HbA1c and the urinary excretion of pentosidine, an advanced glycosylation end-product, with markers of endothelial function in insulin-dependent diabetes mellitus*. Thromb Haemost, 1998. **80**(1): p. 52-7.
199. Steiner, M., et al., *Increased levels of soluble adhesion molecules in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus are independent of glycaemic control*. Thromb Haemost, 1994. **72**(6): p. 979-84.
200. Hackman, A., et al., *Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia*. Circulation, 1996. **93**(7): p. 1334-8.
201. Sampietro, T., et al., *Plasma cholesterol regulates soluble cell adhesion molecule expression in familial hypercholesterolemia*. Circulation, 1997. **96**(5): p. 1381-5.
202. Ferri, C., et al., *Early upregulation of endothelial adhesion molecules in obese hypertensive men*. Hypertension, 1999. **34**(4 Pt 1): p. 568-73.
203. Ito, H., et al., *Weight reduction decreases soluble cellular adhesion molecules in obese women*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2002. **29**(5-6): p. 399-404.
204. Blann, A.D., et al., *Von Willebrand factor and soluble E-selectin in hyperlipidaemia: relationship to lipids and vascular disease*. Am J Hematol, 1997. **55**(1): p. 15-23.
205. Demerath, E., et al., *The relationship of soluble ICAM-1, VCAM-1, P-selectin and E-selectin to cardiovascular disease risk factors in healthy men and women*. Ann Hum Biol, 2001. **28**(6): p. 664-78.
206. Bermudez, E.A., et al., *Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women*. Am J Cardiol, 2002. **89**(9): p. 1117-9.
207. Stone, P.C., et al., *Neutrophil capture by selectins on endothelial cells exposed to cigarette smoke*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **295**(5): p. 1150-5.
208. Jilma, B., et al., *Sex differences in circulating P-selectin, E-selectin and thrombomodulin*. Br J Haematol, 1996. **95**(3): p. 575-6.
209. Jilma, B., et al., *Effects of 17 beta-estradiol on circulating adhesion molecules*. J Clin Endocrinol Metab, 1994. **79**(6): p. 1619-24.
210. Kennedy, G., et al., *Elevated levels of sE-selectin in post-menopausal females are decreased by hormone replacement therapy to levels observed in pre-menopausal females*. Thromb Haemost, 1999. **82**(5): p. 1433-6.
211. Cushman, M., et al., *Effect of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Study*. Circulation, 1999. **100**(7): p. 717-22.

212. Herrington, D.M., et al., *Differential effects of E and droloxifene on C-reactive protein and other markers of inflammation in healthy postmenopausal women*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(9): p. 4216-22.
213. Herrington, D.M., et al., *Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein*. Circulation, 2002. **105**(16): p. 1879-82.
214. Vehkavaara, S., et al., *Effects of oral and transdermal estrogen replacement therapy on markers of coagulation, fibrinolysis, inflammation and serum lipids and lipoproteins in postmenopausal women*. Thromb Haemost, 2001. **85**(4): p. 619-25.
215. Wenzel, K., et al., *E-selectin polymorphism and atherosclerosis: an association study*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(11): p. 1935-7.
216. Wenzel, K., R. Hanke, and A. Speer, *Polymorphism in the human E-selectin gene detected by PCR-SSCP*. Hum Genet, 1994. **94**(4): p. 452-3.
217. Zheng, F., et al., *An HphI polymorphism in the E-selectin gene is associated with premature coronary artery disease*. Clin Genet, 2001. **59**(1): p. 58-64.
218. Graves, B.J., et al., *Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains*. Nature, 1994. **367**(6463): p. 532-8.
219. Jorizzo, J.L., et al., *Neutrophilic vascular reactions*. J Am Acad Dermatol, 1988. **19**(6): p. 983-1005.
220. Rizzi, R., S. Bruno, and R. Dammacco, *Behcet's disease: an immune-mediated vasculitis involving vessels of all sizes*. Int J Clin Lab Res, 1997. **27**(4): p. 225-32.
221. Ates, A., et al., *Serum-soluble selectin levels in patients with Behcet's disease*. Clin Rheumatol, 2007. **26**(3): p. 411-7.
222. Vestweber, D. and J.E. Blanks, *Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 181-213.
223. McEver, R.P. and C. Zhu, *Rolling cell adhesion*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2010. **26**: p. 363-96.
224. Gallatin, W.M., I.L. Weissman, and E.C. Butcher, *A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes*. Nature, 1983. **304**(5921): p. 30-4.
225. Arbones, M.L., et al., *Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice*. Immunity, 1994. **1**(4): p. 247-60.
226. Grailer, J.J., M. Kodera, and D.A. Steeber, *L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation*. J Dermatol Sci, 2009. **56**(3): p. 141-7.
227. Wolberg, A.S., *Determinants of fibrin formation, structure, and function*. Curr Opin Hematol, 2012. **19**(5): p. 349-56.
228. Castell, J.V., et al., *Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6*. Hepatology, 1990. **12**(5): p. 1179-86.
229. Weisel, J.W. and R.I. Litvinov, *Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications*. Blood, 2013. **121**(10): p. 1712-9.
230. Lang, T., et al., *The effects of fibrinogen levels on thromboelastometric variables in the presence of thrombocytopenia*. Anesth Analg, 2009. **108**(3): p. 751-8.
231. Bolliger, D., et al., *Finding the optimal concentration range for fibrinogen replacement after severe haemodilution: an in vitro model*. Br J Anaesth, 2009. **102**(6): p. 793-9.
232. Lance, M.D., et al., *Perioperative dilutional coagulopathy treated with fresh frozen plasma and fibrinogen concentrate: a prospective randomized intervention trial*. Vox Sang, 2012. **103**(1): p. 25-34.
233. Dielis, A.W., et al., *Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(1): p. 125-31.
234. Hemker, H.C., et al., *Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system*. Thromb Haemost, 2006. **96**(5): p. 553-61.

235. Rivera, J., et al., *Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation*. Haematologica, 2009. **94**(5): p. 700-11.
236. Collier, B.S. and S.J. Shattil, *The GPIIb/IIIa (integrin α IIb β 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend*. Blood, 2008. **112**(8): p. 3011-25.
237. Semeraro, N., et al., *Direct induction of tissue factor synthesis by endotoxin in human macrophages from diverse anatomical sites*. Immunology, 1983. **50**(4): p. 529-35.
238. Bevilacqua, M.P., et al., *Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells*. J Exp Med, 1984. **160**(2): p. 618-23.
239. Giesen, P.L., et al., *Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2311-5.
240. Furie, B. and B.C. Furie, *Molecular and cellular biology of blood coagulation*. N Engl J Med, 1992. **326**(12): p. 800-6.
241. Revak, S.D., C.G. Cochrane, and J.H. Griffin, *The binding and cleavage characteristics of human Hageman factor during contact activation. A comparison of normal plasma with plasmas deficient in factor XI, prekallikrein, or high molecular weight kininogen*. J Clin Invest, 1977. **59**(6): p. 1167-75.
242. Pixley, R.A., et al., *A monoclonal antibody recognizing an icosapeptide sequence in the heavy chain of human factor XII inhibits surface-catalyzed activation*. J Biol Chem, 1987. **262**(21): p. 10140-5.
243. Fair, B.D., et al., *Detection by fluorescence of structural changes accompanying the activation of Hageman factor (factor XII)*. Proc Soc Exp Biol Med, 1977. **155**(2): p. 199-202.
244. Vroman, L., *Effects of Hydrophobic Surfaces Upon Blood Coagulation*. Thromb Diath Haemorrh, 1964. **10**: p. 455-93.
245. Silverberg, M. and A.P. Kaplan, *Enzymatic activities of activated and zymogen forms of human Hageman factor (factor XII)*. Blood, 1982. **60**(1): p. 64-70.
246. Griffin, J.H., *Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation factor XII)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(4): p. 1998-2002.
247. Zhuo, R. and E.A. Vogler, *Practical application of a chromogenic FXIIa assay*. Biomaterials, 2006. **27**(28): p. 4840-5.
248. Silverberg, M., et al., *Autoactivation of human Hageman factor. Demonstration utilizing a synthetic substrate*. J Biol Chem, 1980. **255**(15): p. 7281-6.
249. Rawala-Sheikh, R., et al., *Kinetics of coagulation factor X activation by platelet-bound factor IXa*. Biochemistry, 1990. **29**(10): p. 2606-11.
250. Osterud, B., B.N. Bouma, and J.H. Griffin, *Human blood coagulation factor IX. Purification, properties, and mechanism of activation by activated factor XI*. J Biol Chem, 1978. **253**(17): p. 5946-51.
251. Whelihan, M.F., et al., *Coagulation procofactor activation by factor XIa*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(7): p. 1532-9.
252. Muszbek, L., et al., *Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions*. Physiol Rev, 2011. **91**(3): p. 931-72.
253. Mosesson, M.W., *Fibrinogen and fibrin structure and functions*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1894-904.
254. Cesarman-Maus, G. and K.A. Hajjar, *Molecular mechanisms of fibrinolysis*. Br J Haematol, 2005. **129**(3): p. 307-21.
255. Levi, M. and H. Ten Cate, *Disseminated intravascular coagulation*. N Engl J Med, 1999. **341**(8): p. 586-92.

256. Pixley, R.A., et al., *The contact system contributes to hypotension but not disseminated intravascular coagulation in lethal bacteremia. In vivo use of a monoclonal anti-factor XII antibody to block contact activation in baboons.* J Clin Invest, 1993. **91**(1): p. 61-8.
257. Franco, R.F., et al., *The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation.* Blood, 2000. **96**(2): p. 554-9.
258. Levi, M., et al., *The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia.* Eur J Clin Invest, 1997. **27**(1): p. 3-9.
259. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors.* Nature, 2000. **407**(6801): p. 258-64.
260. Riewald, M. and W. Ruf, *Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 7742-7.
261. Camerer, E., W. Huang, and S.R. Coughlin, *Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5255-60.
262. Rao, L.V. and U.R. Pendurthi, *Tissue factor-factor VIIa signaling.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(1): p. 47-56.
263. Chi, L., et al., *Interleukin-6 production by endothelial cells via stimulation of protease-activated receptors is amplified by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha.* J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(4): p. 231-40.
264. Kaplanski, G., et al., *Thrombin induces endothelial type II activation in vitro: IL-1 and TNF-alpha-independent IL-8 secretion and E-selectin expression.* J Immunol, 1997. **158**(11): p. 5435-41.
265. McLean, K., et al., *FXa-induced responses in vascular wall cells are PAR-mediated and inhibited by ZK-807834.* Thromb Res, 2001. **103**(4): p. 281-97.
266. Raza, S.L., et al., *Proteinase-activated receptor-1 regulation of macrophage elastase (MMP-12) secretion by serine proteinases.* J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 41243-50.
267. Naldini, A., et al., *Thrombin regulates the expression of proangiogenic cytokines via proteolytic activation of protease-activated receptor-1.* Gen Pharmacol, 2000. **35**(5): p. 255-9.
268. Cunningham, M.A., et al., *Tissue factor and factor VIIa receptor/ligand interactions induce proinflammatory effects in macrophages.* Blood, 1999. **94**(10): p. 3413-20.
269. Kuijper, P.H., et al., *Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectin- and integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions.* Blood, 1996. **87**(8): p. 3271-81.
270. Huo, Y., et al., *Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E.* Nat Med, 2003. **9**(1): p. 61-7.
271. Vary, T.C. and S.R. Kimball, *Regulation of hepatic protein synthesis in chronic inflammation and sepsis.* Am J Physiol, 1992. **262**(2 Pt 1): p. C445-52.
272. Seitz, R., et al., *The disturbance of hemostasis in septic shock: role of neutrophil elastase and thrombin, effects of antithrombin III and plasma substitution.* Eur J Haematol, 1989. **43**(1): p. 22-8.
273. Kaneider, N.C., et al., *Syndecan-4-dependent signaling in the inhibition of endotoxin-induced endothelial adherence of neutrophils by antithrombin.* Thromb Haemost, 2003. **90**(6): p. 1150-7.
274. Eckle, I., et al., *Protein C degradation in vitro by neutrophil elastase.* Biol Chem Hoppe Seyler, 1991. **372**(11): p. 1007-13.
275. Nawroth, P.P. and D.M. Stern, *Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor.* J Exp Med, 1986. **163**(3): p. 740-5.

276. Taylor, F.B., Jr., et al., *Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of Escherichia coli infusion in the baboon*. J Clin Invest, 1987. **79**(3): p. 918-25.
277. Okajima, K., *Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants*. Immunol Rev, 2001. **184**: p. 258-74.
278. Murakami, K., et al., *Activated protein C attenuates endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting activated leukocytes in rats*. Blood, 1996. **87**(2): p. 642-7.
279. Bernard, G.R., et al., *Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis*. N Engl J Med, 2001. **344**(10): p. 699-709.
280. Campbell, W., N. Okada, and H. Okada, *Carboxypeptidase R is an inactivator of complement-derived inflammatory peptides and an inhibitor of fibrinolysis*. Immunol Rev, 2001. **180**: p. 162-7.
281. Campbell, W.D., et al., *Inactivation of C3a and C5a octapeptides by carboxypeptidase R and carboxypeptidase N*. Microbiol Immunol, 2002. **46**(2): p. 131-4.
282. Conway, E.M., et al., *The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways*. J Exp Med, 2002. **196**(5): p. 565-77.
283. Schleef, R.R., et al., *Cytokine activation of vascular endothelium. Effects on tissue-type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor*. J Biol Chem, 1988. **263**(12): p. 5797-803.
284. Idell, S., *Endothelium and disordered fibrin turnover in the injured lung: newly recognized pathways*. Crit Care Med, 2002. **30**(5 Suppl): p. S274-80.
285. Biemond, B.J., et al., *Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor I release during experimental endotoxaemia in chimpanzees: effect of interventions in the cytokine and coagulation cascades*. Clin Sci (Lond), 1995. **88**(5): p. 587-94.
286. van der Poll, T., et al., *Fibrinolytic response to tumor necrosis factor in healthy subjects*. J Exp Med, 1991. **174**(3): p. 729-32.
287. van der Poll, T., E. de Jonge, and M. Levi, *Regulatory role of cytokines in disseminated intravascular coagulation*. Semin Thromb Hemost, 2001. **27**(6): p. 639-51.
288. Hemker, H.C., et al., *Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2003. **33**(1): p. 4-15.
289. Hemker, H.C., et al., *The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2002. **32**(5-6): p. 249-53.
290. Hemker, H.C., et al., *Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential*. Thromb Haemost, 1993. **70**(4): p. 617-24.
291. International Team for the Revision of the International Criteria for Behcet's, D., et al., *The International Criteria for Behcet's Disease (ICBD): a collaborative study of 27 countries on the sensitivity and specificity of the new criteria*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2013.
292. Bhakta, B.B., et al., *Behcet's disease: evaluation of a new instrument to measure clinical activity*. Rheumatology (Oxford), 1999. **38**(8): p. 728-33.
293. Bowbrick, V.A., D.P. Mikhailidis, and G. Stansby, *Influence of platelet count and activity on thromboelastography parameters*. Platelets, 2003. **14**(4): p. 219-24.
294. Spiezia, L., et al., *Peculiar whole blood rotation thromboelastometry (Rotem) profile in 40 sideropenic anaemia patients*. Thromb Haemost, 2008. **100**(6): p. 1106-10.
295. Probst, K., R. Fijnheer, and A. Rothova, *Endothelial cell activation and hypercoagulability in ocular Behcet's disease*. Am J Ophthalmol, 2004. **137**(5): p. 850-7.

296. Ricart, J.M., et al., *Haemorheological alterations in Behcet's disease are not related to a tendency for venous thrombosis*. Thromb Res, 2005. **115**(5): p. 399-404.
297. Schultz, D.R. and P.I. Arnold, *Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen*. Semin Arthritis Rheum, 1990. **20**(3): p. 129-47.
298. Fries, D., et al., *The effect of fibrinogen substitution on reversal of dilutional coagulopathy: an in vitro model*. Anesth Analg, 2006. **102**(2): p. 347-51.
299. Haas, T., et al., *The in vitro effects of fibrinogen concentrate, factor XIII and fresh frozen plasma on impaired clot formation after 60% dilution*. Anesth Analg, 2008. **106**(5): p. 1360-5, table of contents.
300. Jacquemin, B., et al., *Common genetic polymorphisms and haplotypes of fibrinogen alpha, beta, and gamma chains affect fibrinogen levels and the response to proinflammatory stimulation in myocardial infarction survivors: the AIRGENE study*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(11): p. 941-52.
301. Lovely, R.S., et al., *Fibrinogen gamma' chain carboxy terminal peptide selectively inhibits the intrinsic coagulation pathway*. Br J Haematol, 2007. **139**(3): p. 494-503.
302. Mosesson, M.W., *Update on antithrombin I (fibrin)*. Thromb Haemost, 2007. **98**(1): p. 105-8.
303. Weitz, J.I., et al., *Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors*. J Clin Invest, 1990. **86**(2): p. 385-91.
304. Regnault, V., et al., *Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants*. Thromb Haemost, 2003. **89**(2): p. 208-12.
305. Carmeliet, P. and D. Collen, *Molecular genetics of the fibrinolytic and coagulation systems in haemostasis, thrombogenesis, restenosis and atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 1997. **8**(2): p. 118-25.
306. Aitchison, R., et al., *Defective fibrinolysis in Behcet's syndrome: significance and possible mechanisms*. Ann Rheum Dis, 1989. **48**(7): p. 590-3.
307. Demirer, S., et al., *Haemostasis in patients with Behcet's disease*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2000. **19**(6): p. 570-4.
308. Ricart, J.M., et al., *Fibrinolytic inhibitor levels and polymorphisms in Behcet disease and their association with thrombosis*. Br J Haematol, 2008. **141**(5): p. 716-9.
309. Shang, H., et al., *Anticoagulant and Fibrinolytic Disorders in Patients with Behcet's Disease and Recurrent Aphthous Ulcer*. Chin J Physiol, 2011. **54**(4): p. 235-40.
310. Jankun, J., et al., *Accelerated thrombus lysis in the blood of plasminogen activator inhibitor deficient mice is inhibited by PAI-1 with a very long half-life*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(4): p. 673-80.
311. Kupesiz, A., et al., *Tissue plasminogen activator induced fibrinolysis: standardization of method using thromboelastography*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2010. **21**(4): p. 320-4.
312. Sayinalp, N., et al., *Cytokines in Behcet's disease*. J Rheumatol, 1996. **23**(2): p. 321-2.
313. Evereklioglu, C., et al., *Serum levels of TNF-alpha, sIL-2R, IL-6, and IL-8 are increased and associated with elevated lipid peroxidation in patients with Behcet's disease*. Mediators Inflamm, 2002. **11**(2): p. 87-93.
314. Sun, A., et al., *Treatment with levamisole and colchicine can result in a significant reduction of IL-6, IL-8 or TNF-alpha level in patients with mucocutaneous type of Behcet's disease*. J Oral Pathol Med, 2009. **38**(5): p. 401-5.
315. van Hinsbergh, V.W., et al., *Tumor necrosis factor increases the production of plasminogen activator inhibitor in human endothelial cells in vitro and in rats in vivo*. Blood, 1988. **72**(5): p. 1467-73.

316. Pircher, J., et al., *Prothrombotic effects of tumor necrosis factor alpha in vivo are amplified by the absence of TNF-alpha receptor subtype 1 and require TNF-alpha receptor subtype 2*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(5): p. R225.
317. Cao, Y., et al., *(-)-epigallocatechin gallate inhibits TNF-alpha-induced PAI-1 production in vascular endothelial cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 2013. **62**(5): p. 452-6.
318. Brogren, H., et al., *Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1*. Blood, 2004. **104**(13): p. 3943-8.
319. Wang, J., J. Li, and Q. Liu, *Association between platelet activation and fibrinolysis in acute stroke patients*. Neurosci Lett, 2005. **384**(3): p. 305-9.
320. Nylander, M., et al., *The role of thrombin receptors PAR1 and PAR4 for PAI-1 storage, synthesis and secretion by human platelets*. Thromb Res, 2012. **129**(4): p. e51-8.
321. Fujii, S., W.E. Hopkins, and B.E. Sobel, *Mechanisms contributing to increased synthesis of plasminogen activator inhibitor type 1 in endothelial cells by constituents of platelets and their implications for thrombolysis*. Circulation, 1991. **83**(2): p. 645-51.
322. Slivka, S.R. and D.J. Loskutoff, *Platelets stimulate endothelial cells to synthesize type 1 plasminogen activator inhibitor. Evaluation of the role of transforming growth factor beta*. Blood, 1991. **77**(5): p. 1013-9.
323. Pihusch, V., et al., *Transforming growth factor beta-1 released from platelets contributes to hypercoagulability in veno-occlusive disease following hematopoietic stem cell transplantation*. Thromb Res, 2005. **116**(3): p. 233-40.
324. Chajek, T. and M. Fainaru, *Behcet's disease with decreased fibrinolysis and superior vena caval occlusion*. Br Med J, 1973. **1**(5856): p. 782-3.
325. Cunliffe, W.J., B.E. Roberts, and B. Dodman, *Behcet's syndrome and oral fibrinolytic therapy*. Br Med J, 1973. **2**(5864): p. 486-7.
326. Bernhard, H., et al., *Thrombin generation in pediatric patients with Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(11): p. 2333-9.
327. Hayashi, T., et al., *Correlations between global clotting function tests, duration of operation, and postoperative chest tube drainage in pediatric cardiac surgery*. Paediatr Anaesth, 2011. **21**(8): p. 865-71.
328. Tauber, H., et al., *Prevalence and impact of abnormal ROTEM(R) assays in severe blunt trauma: results of the 'Diagnosis and Treatment of Trauma-Induced Coagulopathy (DIA-TRE-TIC) study'*. Br J Anaesth, 2011. **107**(3): p. 378-87.
329. Yurdakul, S., et al., *Fibrinolytic activity and d-dimer levels in Behcet's syndrome*. Clin Exp Rheumatol, 2005. **23**(4 Suppl 38): p. S53-8.
330. Tayer-Shifman, O.E., et al., *Major vessel thrombosis in Behcet's disease: the dilemma of anticoagulant therapy - the approach of rheumatologists from different countries*. Clin Exp Rheumatol, 2012. **30**(5): p. 735-40.
331. Uzun, O., T. Akpolat, and L. Erkan, *Pulmonary vasculitis in behcet disease: a cumulative analysis*. Chest, 2005. **127**(6): p. 2243-53.
332. Kahraman, O., Celebi-Onder, S., Kamali, S., et al., *Long-term course of deep venous thrombosis in patients with Behçet's disease*. Proceedings of the American College of Rheumatology 67th Annual Scientific Meeting, Orlando, Florida. New Jersey, USA: Wiley, 2003(S385).
333. Calamia, K.T., M. Schirmer, and M. Melikoglu, *Major vessel involvement in Behcet disease*. Curr Opin Rheumatol, 2005. **17**(1): p. 1-8.
334. Galis, Z.S. and J.J. Khatri, *Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly*. Circ Res, 2002. **90**(3): p. 251-62.
335. Descamps, F.J., et al., *Interphotoreceptor retinoid-binding protein as biomarker in systemic autoimmunity with eye inflammations*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(6A): p. 2449-56.

336. Gerlach, R.F., et al., *Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma*. Clin Biochem, 2007. **40**(1-2): p. 119-23.
337. Jung, K., F. Mannello, and M. Lein, *Translating molecular medicine into clinical tools: doomed to fail by neglecting basic preanalytical principles*. J Transl Med, 2009. **7**: p. 87.
338. Mason, P.J., et al., *Plasma, serum, and platelet expression of CD40 ligand in adults with cardiovascular disease*. Am J Cardiol, 2005. **96**(10): p. 1365-9.
339. Viallard, J.F., et al., *Increased soluble and platelet-associated CD40 ligand in essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis*. Blood, 2002. **99**(7): p. 2612-4.
340. Ohashi, Y., et al., *Soluble CD40 ligand and interleukin-6 in the coronary circulation after acute myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2006. **112**(1): p. 52-8.
341. Tousoulis, D., et al., *Oxidative stress and inflammatory process in patients with atrial fibrillation: the role of left atrium distension*. Int J Cardiol, 2009. **136**(3): p. 258-62.
342. Chen, C., et al., *Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells*. Blood, 2008. **112**(8): p. 3205-16.
343. Freysdottir, J., S. Lau, and F. Fortune, *Gammadelta T cells in Behcet's disease (BD) and recurrent aphthous stomatitis (RAS)*. Clin Exp Immunol, 1999. **118**(3): p. 451-7.
344. Hamzaoui, K., et al., *Cytokine profile in Behcet's disease patients. Relationship with disease activity*. Scand J Rheumatol, 2002. **31**(4): p. 205-10.
345. Law, C.L. and I.S. Grewal, *Therapeutic interventions targeting CD40L (CD154) and CD40: the opportunities and challenges*. Adv Exp Med Biol, 2009. **647**: p. 8-36.
346. Boumpas, D.T., et al., *A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(3): p. 719-27.
347. Schonbeck, U., et al., *Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture?* Circ Res, 1997. **81**(3): p. 448-54.
348. Lollini, P.L., et al., *Expression of functional CD40 on human osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(8): p. 1843-9.
349. Mach, F., et al., *T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation*. Am J Pathol, 1999. **154**(1): p. 229-38.
350. Smola-Hess, S., et al., *CD40L induces matrix-metalloproteinase-9 but not tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in cervical carcinoma cells: imbalance between NF-kappaB and STAT3 activation*. Exp Cell Res, 2001. **267**(2): p. 205-15.
351. Li, G., et al., *CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury*. Am J Pathol, 2008. **172**(4): p. 1141-52.
352. Baharav E, W.A., Mor F., *Experimental models of Behçet's Disease*. Drug Disc Today: Dis Models 2006. **2**: p. 11-14.
353. Cecchetti, L., et al., *Megakaryocytes differentially sort mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors into platelets: a mechanism for regulating synthetic events*. Blood, 2011. **118**(7): p. 1903-11.
354. Lutgens, E., et al., *Deficient CD40-TRAF6 signaling in leukocytes prevents atherosclerosis by skewing the immune response toward an antiinflammatory profile*. J Exp Med, 2010. **207**(2): p. 391-404.
355. Zhou, L., et al., *Inhibition of the CD40 pathway of monocyte activation by triazolopyrimidine*. Clin Immunol, 1999. **93**(3): p. 232-8.
356. Kato, Y., et al., *Effect of trapidil on effector functions of monocytes related to atherosclerotic plaque*. Eur J Pharmacol, 2001. **428**(3): p. 371-9.

357. Zhou, L., et al., *Trapidil inhibits monocyte CD40 expression by preventing IFN-gamma-induced STAT1 S727 phosphorylation*. *Int Immunopharmacol*, 2004. **4**(7): p. 863-71.

9. Publicaciones

RESEARCH

Open Access

Behçet's disease: new insight into the relationship between procoagulant state, endothelial activation/damage and disease activity

Ihosvany Fernández-Bello¹, Francisco J López-Longo², Elena G Arias-Salgado¹, Víctor Jiménez-Yuste^{1,3} and Nora V Butta^{1*}

Abstract

Background: Behçet disease (BD) is associated with a prothrombotic state of unknown origin that may lead to life-threatening events. Calibrated Automated Thrombogram (CAT) and Rotational Thromboelastometry (ROTEM) are two global haemostasis assays that may reveal new insights into the physiopathological mechanisms of the disease and its procoagulant condition.

Methods: 23 BD patients who had no signs or symptoms of current thrombosis and 33 age- and sex-matched controls were included in the study. We performed ROTEM and CAT tests and assessed erythrocyte count, platelet count, platelet contribution to clot formation and plasma levels of tissue-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), fibrinogen, C-reactive protein (CRP), thrombin-antithrombin III complex (TAT), D-dimer and E-selectin (ES).

Results: Both ROTEM and CAT tests showed a hypercoagulable state in the BD patients. Plasma levels of PAI-1, fibrinogen, TAT, CRP and ES were significantly increased in this group compared to controls. The disease activity (DA) was significantly correlated with levels of ES and the maximum clot firmness, and this last one, in turn, correlated with rising levels of ES, PAI-1, CRP and fibrinogen. CAT parameters did not correlate with DA or ES.

Conclusions: Both ROTEM and CAT tests reveal that patients with BD have a procoagulant state even in the absence of thrombosis. ROTEM test indicates that increased levels of fibrinogen and PAI-1 may be involved in the prothrombotic state of this pathology, while platelets do not significantly contribute. Moreover, CAT assay demonstrate that plasma from BD patients is able to generate more thrombin than controls in response to the same stimulus and that this effect is independent of the DA and the endothelial impairment suggesting the involvement of another factor in the hypercoagulable state observed in BD patients. This study also shows that endothelium activation/damage may be a contributing factor in both the procoagulant and clinical conditions of BD, as shown by the direct correlation between ES levels, ROTEM parameters and DA.

Keywords: Behçet, E-selectin, PAI-1, Fibrinogen, Thromboelastometry, Thrombin generation, Prothrombotic state

* Correspondence: nora.butta@salud.madrid.org

¹Hematology Unit, Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Introduction

Behçet's disease (BD), also known as Adamantiades–Behçet's disease, is a rare multisystem, inflammatory disease of unknown aetiology [1] and is associated with thrombogenicity [2]. Gender distribution and clinical expression of BD varies with ethnic origin and seems to depend on the geographic area of the BD patients' residence [3].

The diagnosis of BD is primarily based on clinical manifestations. New international criteria [3] have recently been published as diagnostic criteria for BD and include vascular manifestations, which is of great importance due to the frequency of serious vascular and large vessel involvement as has been recently reported [4]. However, patients who were diagnosed according to the International Study Group Criteria (1990) [5] also meet the new International Criteria (2013).

The pathogenesis of the prothrombotic state in BD is not known, although associated vascular damage/activation seems to be an important key factor [6,7]. Increased levels of several procoagulant markers [6,8], defective fibrinolysis [8–11], and altered platelet function [12,13] are some of the numerous findings that have been obtained to date; however, these variables have been investigated individually using various methods and, in some cases, have led to conflicting results.

In recent years, there has been growing interest in the use of global coagulation tests in the evaluation of bleeding diathesis and the hypercoagulable state. Rotational thromboelastometry (ROTEM) is a viscoelastometric clotting test that measures the kinetics of clot formation and fibrinolysis, providing global information on the cellular and soluble procoagulant/anticoagulant protein interactions. Calibrated automated thrombogram (CAT) is a thrombin generation test developed by Hemker *et al.* [14] that quantifies thrombin generation beyond the end points of traditional coagulation tests. Both techniques have been applied successfully to the study of the procoagulant state associated with various conditions, including inflammatory states [15–17].

Considering that haemostasis emerges from the interplay between different cells, coagulation factors and inhibitors, these global tests may reveal a better understanding of the hypercoagulable condition in BD than has been obtained so far through subrogated and isolated procoagulant markers. Therefore, we investigated the potential utility of ROTEM and CAT in the characterisation of the procoagulant state in BD and assessed whether these tests offer a new insight into the physiopathological mechanisms of the disease and its procoagulant profile.

Methods

Study design and subjects

This was a case–control study. Patients diagnosed with BD, according to the criteria of the *International Study*

Group for Behçet's Disease [5], who were over 18 years of age and who attended the Rheumatology Unit of the Gregorio Marañón University Hospital were invited to participate in the study. The activity index was determined as described by the Bhakta *et al.* guidelines [18]. Healthy blood donors from the blood donation centre of the La Paz University Hospital were included as controls. The hospital ethic committee approved the experimental protocol, and subjects were included after signing the informed consent. Exclusion criteria were smoking, the use of oral contraceptives, anticoagulant or active antiplatelet drugs, uncontrolled hypertension, diabetes, hyperlipidaemia, peripheral or coronary artery disease, the presence of abnormal hepatic or renal function, antiphospholipid antibodies (anticardiolipin, anti-beta2-glycoprotein I and lupus anticoagulant) and lupus.

Collection and handling of samples

To avoid the influence of circadian changes in the study variables, the collection time was the same for all subjects (between 9 A.M. and 10 A.M.). Peripheral blood was collected in ethylenediaminetetraacetic acid tubes (Becton, Dickinson and Company, Madrid, Spain) for blood cell count and in sodium citrate (1.3%) tubes (Becton, Dickinson and Company, Madrid, Spain) for the remaining tests. Citrated whole blood was centrifuged at 2500 g for 20 min at 23°C to obtain platelet poor plasma (PPP). PPP aliquots were stored immediately at –70°C until analysis. All samples were analysed or stored properly within two hours of sampling.

Calibrated Automated Thrombogram (CAT)

Thrombin generation was measured in PPP by CAT as described previously [14]. All measurements were performed after 10 minutes of preheating at 37°C. Coagulation was triggered by proper recalcification and the addition (final concentrations) of 1 pM of recombinant human tissue factor and 4 µM of phospholipid mixture (PPP-Reagent LOW, Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands). Lag time (LT, time required for the formation of 10 nM thrombin), time-to-peak (TTP, time required to reach the maximum thrombin concentration), peak height (PH, maximum thrombin concentration achieved), and endogenous thrombin potential (ETP, area under the thrombin concentration vs. time curve) were calculated with the Thrombinoscope software package (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands). The velocity index (VI), a parameter related to the speed with which thrombin is produced, was calculated from the experimental data as follows:

$$VI = \frac{PH}{(TTP-LT)}$$

Rotational Thromboelastometry (ROTEM)

ROTEM was performed on whole blood that was allowed to rest at room temperature for 30 min before testing. A partial thromboplastin phospholipid and ellagic acid-activated intrinsic pathway (INTEM test) was performed to assess the kinetics of clot formation. We recorded the clot formation time (INTEM-CFT, time to 20-mm amplitude [in seconds], which reflects the speed of the clotting process), alpha angle (INTEM-α, tangent to the curve at 2-mm amplitude [in degrees], which reflects the rate of fibrin polymerisation), and maximum clot firmness (INTEM-MCF, maximum clot firmness [in mm], which reflects the maximum tensile strength of the thrombus). To assess the contribution of platelets to the clot kinetics, a platelet-inhibited FIBTEM test was performed and compared with the INTEM test for MCF using the following formula:

$$\begin{aligned} & \text{Platelet contribution (MCF)} \\ &= \frac{[\text{INTEM (MCF)} - \text{FIBTEM (MCF)}]}{\text{INTEM (MCF)}} \times 100 \end{aligned}$$

Cell count, biochemistry and study of fibrinolysis

The blood cell count was performed with a Coulter Ac T Diff cell counter (Beckman Coulter, Madrid, Spain). Plasma levels of D-dimer (DD) and fibrinogen were determined using a BCS[®] XP system (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany) and C-reactive protein (CRP) was measured by nephelometric method (Behring Nephelometer Analyzer, Germany). Thrombin-antithrombin III complex (TAT) (AssayMax Human Thrombin-antithrombin Complexes ELISA Kit, ASSAYPRO, St. Charles, MO, USA) and E-selectin (ES) (Human sE-Selectin/CD26E Immunoassay Quantikine[®] ELISA kit, R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, UK) were measured in PPP, following the manufacturer's instructions. The fibrinolytic profile was evaluated by assessing plasma antigenic levels of tissue-type plasminogen activator (t-PA) (TriniLIZE tPA antigen ELISA kit) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) (TriniLIZE PAI-1 antigen ELISA kit); all kits were acquired from Trinity Biotech, Bray, Co Wicklow, Ireland.

Statistical analysis

The results are expressed as the mean ± SD, the median and range (25th-75th percentile) or as the absolute value (percentage of the total). We performed an unpaired Student's *t*-test and the Mann-Whitney *U* test as needed to compare variables between the groups. The asso-

ciations between the variables were calculated using Pearson's or Spearman's correlation test, depending on the data distribution. Normality was tested by a Shapiro-Wilk test. Statistical analyses were performed using SPSS software version 17.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Values of *P* ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

Of the 33 unrelated BD patients interviewed, 23 were included and compared with 33 age and gender matched healthy subjects. Ten patients were excluded because they did not fulfil inclusion criteria. None of the interviewed patients had signs or symptoms of current thrombosis. The clinical and treatment characteristics of the patients are summarised in Table 1.

Cell count, biochemistry and study of fibrinolysis

We found significantly increased levels of fibrinogen, CRP, PAI-1 antigen, TAT and ES in the BD patients (Table 2). There were no significant differences in the other variables between the groups (Table 2).

Rotational Thromboelastometry (ROTEM)

The coagulation profiles assessed by the ROTEM test showed enhanced coagulation in patients with BD. The clot formation speed (evaluated by INTEM-α and INTEM-CFT) and the INTEM-MCF were significantly higher in this group (Table 2). INTEM-MCF showed correlations with fibrinogen levels in both patients and controls (patients: *r* = 0.620, *p* = 0.005; controls: *r* = 0.638, *p* = 0.002) and with CRP in the BD group (*r* = 0.384, *p* = 0.02). INTEM-MCF, INTEM-α and INTEM-CFT were affected by the levels of PAI-1 (INTEM-MCF: *r* = 0.648, *p* = 0.012; INTEM-α: *r* = 0.650, *p* = 0.012 and INTEM-CFT: *r* = -0.690, *p* = 0.006) in the BD patients. In controls, INTEM-CFT correlated with the levels of PAI-1 (*r* = 0.645, *p* = 0.044). The calculated percentage of platelet contribution to INTEM-MCF was similar in both groups, suggesting a poor contribution of platelets to the procoagulant state observed by thromboelastometry in the BD patients (Table 2).

Calibrated Automated Thrombogram (CAT)

LT, PH, ETP and VI were significantly increased in patients with BD (Table 2). In this group, the levels of fibrinogen correlated with LT (*r* = 0.622, *p* = 0.004), TTP (*r* = 0.548, *p* = 0.015) and ETP (*r* = 0.452, *p* = 0.05). We found a moderate negative correlation between LT and INTEM-CFT (*r* = -0.568, *p* = 0.007) and a moderate positive correlation between LT and INTEM-α (*r* = 0.536, *p* = 0.012). This provided compelling evidence that the increased thrombus formation in BD patients was associated with a delay in the start of thrombin gene-

Table 1 Clinical features and treatment of BD patients at the time of the study and cumulative

Characteristic	At time of the study	Cumulative
Clinical features: N = 23		
Disease duration in years (mean \pm SD)	15 \pm 8	-
Deep vein thrombosis (%)	0	4
Disease activity, median (p25-p75)	7 (2-18)	-
Patients on active phase of disease (%)	78	-
Genital ulcer (%)	13	97
Oral ulcer (%)	52	100
Skin lesion (%)	43	90
Vascular involvement (%)	0	21
Articular involvement (%)	43	67
Gastrointestinal involvement (%)	30	32
Ocular involvement (%)	22	64
Neurological involvement (%)	43	72
Treatments:		
Prednisone (< 10 mg) (%)	9	83
Prednisone (> 10 mg) (%)	18	87
Cyclosporine (%)	4	18
Azathioprine (%)	9	32
Methotrexate (%)	4	7
Infliximab (%)	4	3
Rituximab (%)	4	7
Colchicine (%)	17	86

ration in the CAT test. However, we observed a positive dependence between PH and the rate of fibrin polymerisation (INTEM- α : $r = 0.432$, $p = 0.05$), which suggests that the increase in the clot formation speed might be related with the higher thrombin generation capacity in this group.

Relationship between DA, coagulation status and endothelial cell injury/activation

We observed correlations between DA and INTEM-MCF, INTEM- α and ES levels (Figure 1), indicating that increased DA was associated with a higher thrombus formation capacity and more severe vascular injury/activation. In turn, the ES levels correlated with INTEM-CFT, INTEM-MCF and INTEM- α (Figure 2), suggesting a possible relationship between endothelial cell injury/activation and the hypercoagulable state observed by the ROTEM test in the BD patients. Except for the fibrinogen and INTEM-MCF, there were no correlations between ROTEM parameters and the other variables in the control group.

We also observed a significant correlation between antigenic levels of PAI-1 and DA ($r = 0.739$, $p = 0.009$) and ES levels ($r = 0.640$, $p = 0.034$) in patients with active disease (DA > 0), which implicates PAI-1 as a potential link between vasculitis and/or the inflammatory state and enhanced clot formation in BD patients. The CAT parameters failed to correlate with ES levels and DA in the BD patients.

Discussion

As far as we know, this is the first report on the use of ROTEM and CAT in the study of the procoagulant state in BD. The present study has shown that thrombin generation and blood clotting capacity were increased in BD patients, even in the absence of thrombosis. Additionally, we found significant correlations between the ROTEM parameters, plasma ES levels and DA, which suggests links between the procoagulant state, endothelial inflammation and severity of symptoms of the disease.

We found increased levels of fibrinogen in our group of patients with BD. This result is consistent with those observed in previous studies [19-21] and is not surprising considering that 78% of our patients were in an active state and that fibrinogen is an acute phase reactant [22]. The procoagulant effect of fibrinogen on ROTEM parameters has been reported previously [23], and our results are in agreement with this effect. We observed that fibrinogen levels were significantly correlated with INTEM-MCF in both patients and controls, which suggests that increased levels of fibrinogen in the BD group might be involved in the group's hypercoagulable profile, as determined by the ROTEM test. Surprisingly, although INTEM-MCF correlated significantly with the fibrinogen levels and DA, we did not observe any dependence between the fibrinogen levels and DA. This issue, which was also observed by Hampton *et al.* [19], is intriguing but may be the result of the high variability of the fibrinogen synthesis route due to alternative mRNA processing, post-translational modifications and proteolytic degradation, which may lead to different levels of fibrinogen in response to similar inflammatory states [24]. Fibrinogen may also affect thrombin generation. Dielis *et al.* have shown that fibrinogen may produce not only an anticoagulant effect by increasing LT but also a procoagulant effect by heightening ETP and PH values in normal populations [25]. This dual anticoagulant/procoagulant effect can be explained by the spatial distribution of the thrombin's binding sites and the kinetics of interaction with its multiple substrates. Increased fibrinogen levels may prolong LT because of this molecule's ability to bind to thrombin through exosite II, which is needed for the thrombin-mediated FVIII activation. This fibrinogen binding leads to an

Table 2 Demographic features, ROTEM and CAT results of both groups

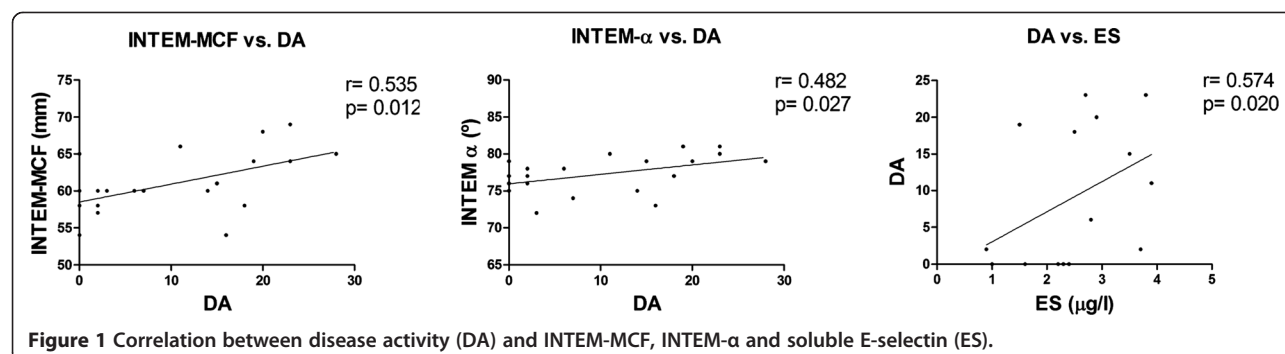
Characteristics		BD patients (N = 23)	Controls (N = 33)	p-value
Age at inclusion (year)		49 ± 15	43 ± 10	0.082
Female gender (%)		78	63	0.241
ROTEM	INTEM-α (degree)	77 ± 3	74 ± 2	<0.010
	INTEM-CFT (sec)	66 ± 15	80 ± 14	<0.010
	INTEM-MCF (mm)	61 ± 4	57 ± 4	<0.010
	Platelet contribution-MCF (%)	78 (69–79)	79 (77–81)	0.090
CAT	Lag-time (min)	6.7 ± 1.8	5.6 ± 1.1	0.025
	Time-to-peak (min)	9.6 ± 1.9	9.0 ± 1.4	0.240
	Peak height (nM)	292 ± 65	213 ± 67	<0.010
	ETP (nM × min)	1543 ± 331	1286 ± 292	0.010
	Velocity index (nM/min)	102 (83–127)	55 (42–90)	<0.010
Other parameters	Platelet count (×10 ³ /μl)	217 (189–287)	227 (199–247)	0.785
	Erythrocyte count (×10 ⁶ /μl)	4.2 ± 0.4	4.3 ± 0.4	0.244
	Fibrinogen (mg/l)	321 ± 53	280 ± 42	<0.010
	TAT (ng/l)	19 (17–21)	15 (12–17)	<0.010
	D-dimer (μg/l)	293 ± 65	270 ± 86	0.480
	tPA (antigen) (ng/ml)	17.2 ± 7.2	12.4 ± 5.2	0.120
	PAI-1 (antigen) (ng/ml)	19.9 ± 8.6	12.6 ± 6.0	0.032
	E-selectin (μg/l)	24.2 ± 9.3	16.8 ± 8.4	0.040
	C-reactive protein (mg/dl)	0.2 (0.1–0.5)	0.1 (0.1–0.4)	0.046

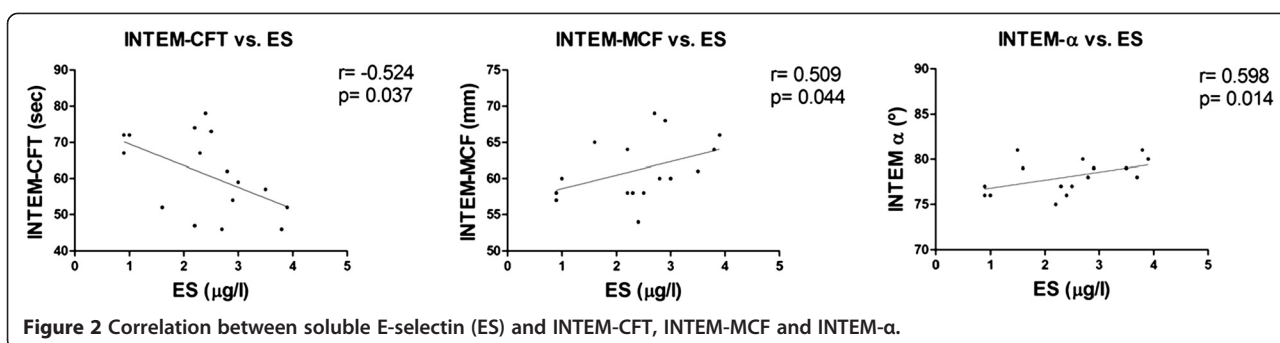
Results are expressed as the mean ± SD, the median and range (25th–75th percentile) or as absolute value (%).

anticoagulant effect in the initiation phase at low tissue factor concentrations [26,27]. This evidence has also been supported by Hemker *et al.* who compared thrombin generation in full and defibrinated plasma [28]. It is interesting to mention that a prolonged LT despite an increased thrombotic risk is observed in patients with antiphospholipid syndrome [29] which suggests that an extended LT does not rule out the presence of a prothrombotic state. Fibrinogen may also increase thrombin generation due to fibrin's ability to protect thrombin from inhibition by antithrombin III [28,30]. Our results agree with these hypotheses, given that we found a significant positive correlation between fibrinogen levels and ETP in patients with BD. In summary, although fibrinogen could induce an anticoagulant ef-

fect by increasing the LT for generating thrombin, the amount of thrombin generated (ETP) and the strength of the clot (INTEM-MCF) were increased by higher levels of fibrinogen in the BD group. This condition could be responsible, at least in part, for the procoagulant pattern observed in the BD patients by the two global tests.

Previous studies have reported a correlation between platelet count (PTS) and clot formation speed and strength [31]. However, we did not find any differences in PTS between the patients and the controls. Although higher platelet activation and response to stimulus have been reported in BD patients [13,32], our research group recently published a study of platelet function in the same group of BD patients included in the present study





and found no differences in platelet activation markers between the controls and the BD patients, either at baseline conditions or after stimulation with agonists (TRAP and ADP) [33]. After considering this finding and the lack of differences in PTS and platelet contribution to the ROTEM trace between the groups, we conclude that platelets are not the cause of the deviation in the ROTEM results.

A study by Spiezia *et al.* (2008) suggests that erythrocyte count (ERY) may decrease clot firmness [34]. In the present study, we did not observe any significant differences in the ERY between the patients and controls, and therefore the contribution of ERY to the differences observed in the ROTEM trace between the two groups seems negligible.

It has been reported that abnormal fibrinolysis may contribute to thrombosis, atherosclerosis and vascular stenosis [35]. Fibrinolysis has been previously studied in BD with conflicting results, which was probably due to the high variability of patients included in the studies and the different assays used in each case [8-10,19,36-38]. In the present study, BD patients showed tPA antigen levels similar to controls but had significantly increased PAI-1 antigen plasma levels, suggesting a possible hypofibrinolytic profile in this group. Systemic inflammation as presented in BD could increase PAI-1 levels [39,40]. Moreover, it has been reported that platelet stimulation by thrombin induces platelet synthesis and release of active PAI-1 [41,42] and, in fact, increased platelet activation has been highly correlated to plasma PAI-1 activity in acute stroke patients [43]. Thrombin may also stimulate platelet synthesis and secretion of TGF beta [44-46]. TGF beta, in turn, may increase the synthesis of PAI-1 in endothelial cells [44-46]. These mechanisms may explain, at least in part, the increased plasma levels of PAI-1 in BD patients because they show systemic activation of coagulation and increased thrombin production in response to stimulus. Increased levels of PAI-1 can increase the clot formation speed and clot stability [47,48] due to the rapid and irreversible blockage of the protease activity of tPA, the main plasminogen activator [49]. Our results agree with

this observation given that we found a significant correlation between antigenic levels of PAI-1 and INTEM-CFT, INTEM- α and INTEM-MCF, which points to PAI-1 as a key factor in the procoagulant state observed in BD patients by this test. In spite of the fact that an association between levels of PAI-1 and thrombosis in BD has not been reported, relief from vascular events and oral ulcers after treatment with profibrinolytic agents has been observed in these patients [50,51]. Moreover, we and other groups have observed a positive correlation between PAI-1 levels and DA, suggesting a probable association between the impaired fibrinolysis in BD and the severity of the disease symptoms [19,52]. Whether this finding reflects a causal relation between BD symptoms and defective fibrinolysis is an issue that needs to be evaluated in further studies with larger numbers of patients.

The procoagulant state observed by the CAT and ROTEM tests in the BD patients was supported by the increase in plasma TAT, a marker of intravascular thrombin formation. However, the TAT level did not correlate to the ROTEM and CAT parameters. A lack of correlation between TAT levels and CAT and ROTEM values has been previously reported [53-55] which suggests that the TAT level might indicate that activation of coagulation had occurred but does not necessarily reflect the patient's procoagulant potential at the time of the sampling.

In contrast to previous reports that indicated high DD levels in BD patients with active disease and deep vein thrombosis [11], we did not find any differences in DD between the BD patients and controls. This controversial result may be due to the absence of signs, symptoms or recent history of thrombosis in our patients.

Endothelial damage has been described as a potential key factor involved in the prothrombotic state of BD [7,8], and ES, a marker of endothelial damage/activation, has been found to be increased in the active state of the disease [56]. Our results were in correspondence with this data as we found higher levels of ES in the BD patients compared with controls that correlate with DA (Figure 1). When analyzing the correlation between ES

and ROTEM and CAT parameters, we found a significant correlation between ES levels and the ROTEM parameters but not between ES levels and the CAT parameters. We also failed to obtain any correlation between CAT parameters and DA that by the contrary showed correlation with the procoagulant profile observed by the ROTEM test. One hypothesis to explain this effect may be based on the fact that the CAT test is only able to depict the thrombin generation capacity of the plasma, whereas the ROTEM test describes thrombin generation, clot formation and fibrinolysis. As shown above, these processes may be altered in this disease, and therefore the ROTEM test may be a more appropriate test for describing the associated endothelial and inflammatory pathological condition of the disease.

Our results support the existence of an increased procoagulant state in BD patients, and they raise the question about the usefulness of anticoagulant treatments in these patients. This is a matter of controversy as there is no consensus among rheumatologists from various countries [57] because lifelong anticoagulation treatment might increase the risk of fatal bleeding [58]. Moreover, given that blood vessel wall inflammation is a possible cause of thrombosis in BD patients, the use of immunosuppressive therapy might be a more rational choice [59,60].

Conclusions

The ROTEM test is a useful tool for studying of hypercoagulable state in BD. Additionally, CAT experiments reveal that plasma from BD patients is able to produce faster and higher thrombin generation. Our data also indicated that endothelial activation/damage is involved in both the clinical manifestation and procoagulant state of this pathology. Moreover, the heightening of fibrinogen and PAI-1 may be important components in the procoagulant condition of the disease, whereas the effect of platelets seemed to be almost negligible. Further studies are warranted to evaluate the relationship between PAI-1 levels and the symptoms of the disease and to determine whether the ROTEM test and ES levels are useful tools/markers for monitoring therapeutic response and disease progression in BD patients.

Abbreviations

BD: Behçet disease; CAT: Calibrated automated thrombogram; ROTEM: Rotational thromboelastometry; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor type 1; tPA: tissue-type plasminogen activator; TAT: Thrombin-antithrombin III complex; DD: D-dimer; ES: E-selectin; DA: Disease activity; PPP: Platelet poor plasma; LT: Lag time; TTP: Time-to-peak; PH: Peak height; ETP: Endogenous thrombin potential; VI: Velocity index; CFT: Clot formation time; a: Alpha angle; MCF: Maximum clot firmness; PTS: Platelet count; ERY: Erythrocyte count.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

NVB was the principal investigator, coordinated the group, obtained the funding for the study and participated in study design, statistical analysis and

writing of paper. IFB carried out the CAT and ROTEM experiments and participate in study design, statistical analysis and writing of paper. FJLL recruited the patients, participated in the design of the study, the analysis of the data and helped to draft the manuscript. EGAS: carried out the immunoassays. VJY: participated in the analysis of the data. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We greatly appreciate the skilful collaboration of the nursing staff and assistants from the Blood Donor Section of the Hematology Unit of the Hospital Universitario La Paz and the Rheumatology Unit at the Hospital Universitario Gregorio Marañón. NVB holds a Miguel Servet tenure-track grant from FIS and EGA-S a Ramón y Cajal grant from the Spanish Ministry of Education and Science.

Funding

This work was supported by grants from FIS PS09/00531 and FIS PI12/01831.

Author details

¹Hematology Unit, Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ, Madrid, Spain.

²Rheumatology Unit, Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain.

³Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

Received: 27 February 2013 Accepted: 21 May 2013

Published: 27 May 2013

References

1. Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G: Behcet's disease. *N Engl J Med* 1999, **341**:1284–1291.
2. Koc Y, Gullu I, Akpek G, Akpolat T, Kansu E, Kiraz S, Batman F, Kansu T, Balkanci F, Akkaya S, et al: Vascular involvement in Behcet's disease. *J Rheumatol* 1992, **19**:402–410.
3. International Team for the Revision of the International Criteria for Behcet's D, Davatchi F, Assaad-Khalil S, Calamia KT, Crook JE, Sadeghi-Abdollahi B, Schirmer M, Tzellos T, Zouboulis CC, Akhlagi M, et al: The International Criteria for Behcet's Disease (ICBD): a collaborative study of 27 countries on the sensitivity and specificity of the new criteria. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013. doi:10.1111/jdv.12107.
4. Altenburg A, Mahr A, Maldini C, Kneifel CE, Krause L, Kotter I, Stache T, Bonitsis NG, Zouboulis CC: Epidemiology and clinical aspects of Adamantiades-Behcet disease in Germany. Current data. *Der Ophthalmologe* 2012, **109**:531–541.
5. Criteria for diagnosis of Behcet's disease. International Study Group for Behcet's Disease. *Lancet* 1990, **335**:1078–1080.
6. Haznedaroglu IC, Ozcebe OI, Ozdemir O, Celik I, Dundar SV, Kirazli S: Impaired haemostatic kinetics and endothelial function in Behcet's disease. *J Intern Med* 1996, **240**:181–187.
7. Chambers JC, Haskard DO, Kooner JS: Vascular endothelial function and oxidative stress mechanisms in patients with Behcet's syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2001, **37**:517–520.
8. Espinosa G, Font J, Tassies D, Vidaller A, Deulofeu R, Lopez-Soto A, Cervera R, Ordinas A, Ingelmo M, Reverter JC: Vascular involvement in Behcet's disease: relation with thrombophilic factors, coagulation activation, and thrombomodulin. *Am J Med* 2002, **112**:37–43.
9. Aitchison R, Chu P, Cater DR, Harris RJ, Powell RJ: Defective fibrinolysis in Behcet's syndrome: significance and possible mechanisms. *Ann Rheum Dis* 1989, **48**:590–593.
10. Ricart JM, Ramon LA, Vaya A, Espana F, Santaolalla ML, Todoli J, Castello R, Fontcuberta J, Estelles A: Fibrinolytic inhibitor levels and polymorphisms in Behcet disease and their association with thrombosis. *Br J Haematol* 2008, **141**:716–719.
11. Yurdakul S, Hekim N, Soysal T, Fresko I, Bavunoglu I, Ozbakir F, Tabak F, Melikoglu M, Hamuryudan V, Yazici H: Fibrinolytic activity and d-dimer levels in Behcet's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2005, **23**:S53–S58.
12. Wilson AP, Efthimiou J, Betteridge DJ: Decreased prostacyclin sensitivity of platelets in patients with Behcet's syndrome. *Eur J Clin Invest* 1988, **18**:410–414.
13. Akar S, Ozcan MA, Ates H, Gurler O, Alacacioglu I, Ozsan GH, Akkoc N, Ozkan S, Demirkan F, Onen F: Circulated activated platelets and increased platelet reactivity in patients with Behcet's disease. *Clin Appl Thromb/Hemost* 2006, **12**:451–457.

14. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Beguin S: **Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma.** *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003, **33**:4–15.
15. Luddington RJ: **Thrombelastography/thromboelastometry.** *Clin Lab Haematol* 2005, **27**:81–90.
16. van Veen JJ, Gatt A, Makris M: **Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet?** *Br J Haematol* 2008, **142**:889–903.
17. Ten Cate H: **Thrombin generation in clinical conditions.** *Thromb Res* 2012, **129**:367–370.
18. Bhakta BB, Brennan P, James TE, Chamberlain MA, Noble BA, Silman AJ: **Behcet's disease: evaluation of a new instrument to measure clinical activity.** *Rheumatology (Oxford)* 1999, **38**:728–733.
19. Hampton KK, Chamberlain MA, Menon DK, Davies JA: **Coagulation and fibrinolytic activity in Behcet's disease.** *Thromb Haemost* 1991, **66**:292–294.
20. Lee YJ, Kang SW, Yang JI, Choi YM, Sheen D, Lee EB, Choi SW, Song YW: **Coagulation parameters and plasma total homocysteine levels in Behcet's disease.** *Thromb Res* 2002, **106**:19–24.
21. Probst K, Fijnheer R, Rothova A: **Endothelial cell activation and hypercoagulability in ocular Behcet's disease.** *Am J Ophthalmol* 2004, **137**:850–857.
22. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Fabra R, Trullenque R, Heinrich PC: **Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6.** *Hepatology (Baltimore, Md)* 1990, **12**:1179–1186.
23. Lang T, Johanning K, Metzler H, Piepenbrock S, Solomon C, Rahe-Meyer N, Tanaka KA: **The effects of fibrinogen levels on thromboelastometric variables in the presence of thrombocytopenia.** *Anesth Analg* 2009, **108**:751–758.
24. Jacquemin B, Antoniadis C, Nyberg F, Plana E, Muller M, Greven S, Salomaa V, Sunyer J, Bellander T, Chalamandaris AG, et al: **Common genetic polymorphisms and haplotypes of fibrinogen alpha, beta, and gamma chains affect fibrinogen levels and the response to proinflammatory stimulation in myocardial infarction survivors: the AIRGENE study.** *J Am Coll Cardiol* 2008, **52**:941–952.
25. Dielis AW, Castoldi E, Spronk HM, van Oerle R, Hamulyak K, Ten Cate H, Rosing J: **Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population.** *J Thromb Haemost* 2008, **6**:125–131.
26. Lovely RS, Boshkov LK, Marzec UM, Hanson SR, Farrell DH: **Fibrinogen gamma' chain carboxy terminal peptide selectively inhibits the intrinsic coagulation pathway.** *Br J Haematol* 2007, **139**:494–503.
27. Mossessan MW: **Update on antithrombin I (fibrin).** *Thromb Haemost* 2007, **98**:105–108.
28. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Beguin S: **Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system.** *Thromb Haemost* 2006, **96**:553–561.
29. Regnault V, Beguin S, Wahl D, de Maistre E, Coenraad Hemker H, Lecompte T: **Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants.** *Thromb Haemost* 2003, **89**:208–212.
30. Weitz JI, Hudoba M, Massel D, Maraganoire J, Hirsh J: **Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors.** *J Clin Invest* 1990, **86**:385–391.
31. Bowbrick VA, Mikhailidis DP, Stansby G: **Influence of platelet count and activity on thromboelastography parameters.** *Platelets* 2003, **14**:219–224.
32. Martinez M, Ricart JM, Ruiz-Aja S, Rus A, Todoli J, Calvo J, Vaya A: **Platelet activation and red blood cell phosphatidylserine exposure evaluated by flow cytometry in patients with Behcet's disease: are they related to thrombotic events?** *Pathophysiol Haemost Thromb* 2007, **36**:18–22.
33. Fernandez Bello I, Alvarez MT, Lopez-Longo FJ, Arias-Salgado EG, Martin M, Jimenez-Yuste V, Rodriguez de la Rua A, Butta NV: **Platelet soluble CD40L and matrix metalloproteinase 9 activity are proinflammatory mediators in Behcet disease patients.** *Thromb Haemost* 2012, **107**:88–98.
34. Spiezia L, Radu C, Marchioro P, Bertini D, Rossetto V, Castelli M, Pagnan A, Sorensen B, Simioni P: **Peculiar whole blood rotation thromboelastometry (Rotem) profile in 40 sideropenic anaemia patients.** *Thromb Haemost* 2008, **100**:1106–1110.
35. Carmeliet P, Collen D: **Molecular genetics of the fibrinolytic and coagulation systems in haemostasis, thrombogenesis, restenosis and atherosclerosis.** *Curr Opin Lipidol* 1997, **8**:118–125.
36. Demirel S, Sengul N, Yerdel MA, Tuzuner A, Ulus AT, Gurler A, Bergqvist D, Siegbahn A, Karacagil S: **Haemostasis in patients with Behcet's disease.** *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000, **19**:570–574.
37. Ozoran K, Dugun N, Gurler A, Tutkak H, Tokgoz G: **Plasma von Willebrand factor, tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor, and antithrombin III levels in Behcet's disease.** *Scand J Rheumatol* 1995, **24**:376–382.
38. Shang H, Ye JJ, Ji M, Wang FF, Zhu YY, Qi XM: **Anticoagulant and Fibrinolytic Disorders in Patients with Behcet's Disease and Recurrent Aphthous Ulcer.** *Chin J Physiol* 2011, **54**:235–240.
39. Juhan-Vague I, Alessi MC, Mavri A, Morange PE: **Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk.** *J Thromb Haemost* 2003, **1**:1575–1579.
40. Pircher J, Merkle M, Wormle M, Ribeiro A, Czermak T, Stampnik Y, Mannell H, Niemeyer M, Vielhauer V, Krotz F: **Prothrombotic effects of tumor necrosis factor alpha in vivo are amplified by the absence of TNF-alpha receptor subtype 1 and require TNF-alpha receptor subtype 2.** *Arthritis Res Ther* 2012, **14**:R225.
41. Brogren H, Karlsson L, Andersson M, Wang L, Erlinge D, Jern S: **Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1.** *Blood* 2004, **104**:3943–3948.
42. Nylander M, Osman A, Ramstrom S, Aklint E, Larsson A, Lindahl TL: **The role of thrombin receptors PAR1 and PAR4 for PAI-1 storage, synthesis and secretion by human platelets.** *Thromb Res* 2012, **129**:e51–e58.
43. Wang J, Li J, Liu Q: **Association between platelet activation and fibrinolysis in acute stroke patients.** *Neurosci Lett* 2005, **384**:305–309.
44. Pihusch V, Pihusch M, Penovici M, Kolb HJ, Hiller E, Pihusch R: **Transforming growth factor beta-1 released from platelets contributes to hypercoagulability in veno-occlusive disease following hematopoietic stem cell transplantation.** *Thromb Res* 2005, **116**:233–240.
45. Fujii S, Hopkins WE, Sobel BE: **Mechanisms contributing to increased synthesis of plasminogen activator inhibitor type 1 in endothelial cells by constituents of platelets and their implications for thrombolysis.** *Circulation* 1991, **83**:645–651.
46. Slivka SR, Loskutov DJ: **Platelets stimulate endothelial cells to synthesize type 1 plasminogen activator inhibitor. Evaluation of the role of transforming growth factor beta.** *Blood* 1991, **77**:1013–1019.
47. Jankun J, Aleem AM, Struniawski R, Lysiak-Szydłowska W, Selman SH, Skrzypczak-Jankun E: **Accelerated thrombus lysis in the blood of plasminogen activator inhibitor deficient mice is inhibited by PAI-1 with a very long half-life.** *Pharmacol Rep* 2009, **61**:673–680.
48. Kupesz A, Rajpurkar M, Warrier I, Hollon W, Tosun O, Lusher J, Chitlur M: **Tissue plasminogen activator induced fibrinolysis: standardization of method using thromboelastography.** *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010, **21**:320–324.
49. Mossessan MW: **Fibrinogen and fibrin structure and functions.** *J Thromb Haemost* 2005, **3**:1894–1904.
50. Chajek T, Fainaru M: **Behcet's disease with decreased fibrinolysis and superior vena caval occlusion.** *Br Med J* 1973, **1**:782–783.
51. Cunliffe WJ, Roberts BE, Dodman B: **Behcet's syndrome and oral fibrinolytic therapy.** *Br Med J* 1973, **2**:486–487.
52. Haznedaroglu IC, Ozcebe O, Celik I, Dundar SV, Kirazli S: **Haemostatic markers of procoagulant imbalance in Behcet's disease.** *Eur J Haematol* 1996, **57**:107–108.
53. Tauber H, Innerhofer P, Breitkopf R, Westermann I, Beer R, El Attar I, Strasak A, Mittermayr M: **Prevalence and impact of abnormal ROTEM(R) assays in severe blunt trauma: results of the 'Diagnosis and Treatment of Trauma-Induced Coagulopathy (DIA-TRE-TIC) study'.** *Br J Anaesth* 2011, **107**:378–387.
54. Bernhard H, Deutschmann A, Leschnik B, Schweintzger S, Novak M, Hauer A, Muntean W: **Thrombin generation in pediatric patients with Crohn's disease.** *Inflamm Bowel Dis* 2011, **17**:2333–2339.
55. Hayashi T, Sakurai Y, Fukuda K, Yada K, Ogiwara K, Matsumoto T, Yoshizawa H, Takahashi Y, Yoshikawa Y, Hayata Y, et al: **Correlations between global clotting function tests, duration of operation, and postoperative chest tube drainage in pediatric cardiac surgery.** *Paediatr Anaesth* 2011, **21**:865–871.
56. Haznedaroglu E, Karaaslan Y, Buyukasik Y, Kosar A, Ozcebe O, Haznedaroglu C, Kirazli E, Dundar SV: **Selectin adhesion molecules in Behcet's disease.** *Ann Rheum Dis* 2000, **59**:61–63.
57. Tayer-Shifman OE, Seyahi E, Nowatzky J, Ben-Chetrit E: **Major vessel thrombosis in Behcet's disease: the dilemma of anticoagulant therapy - the approach of rheumatologists from different countries.** *Clin Exp Rheumatol* 2012, **30**:735–740.

58. Uzun O, Akpolat T, Erkan L: **Pulmonary vasculitis in behcet disease: a cumulative analysis.** *Chest* 2005, **127**:2243–2253.
59. Kahraman OC-OS, Kamali S, *et al*: *Long-term course of deep venous thrombosis in patients with Behçet's disease*, Proceedings of the American College of Rheumatology 67th Annual Scientific Meeting. Orlando, Florida New Jersey, USA: Wiley; 2003.
60. Yazici H, Pazarli H, Barnes CG, Tuzun Y, Ozyazgan Y, Silman A, Serdaroglu S, Oguz V, Yurdakul S, Lovatt GE, *et al*: **A controlled trial of azathioprine in Behcet's syndrome.** *N Engl J Med* 1990, **322**:281–285.

doi:10.1186/1750-1172-8-81

Cite this article as: Fernández-Bello *et al*: Behçet's disease: new insight into the relationship between procoagulant state, endothelial activation/damage and disease activity. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2013 **8**:81.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Rotational thromboelastometry (ROTEM) in Behçet's disease

I. Fernández-Bello · F. J. López-Longo ·
E. G. Arias-Salgado · V. Jiménez-Yuste ·
N. V. Butta

Received: 5 September 2013 / Accepted: 17 September 2013 / Published online: 28 September 2013
© Clinical Rheumatology 2013

Dear Sirs,

We very much appreciated the brief report by Bilge et al. recently published in *Clinical Rheumatology* [1] about the utility of rotational thromboelastometry (ROTEM) in Behçet's disease (BD). Bilge et al. reported a significant increase in maximum clot firmness (MCF) in a cohort of patients with BD, which may indicate a prothrombotic state in this disease. This report is in line with a study we recently published [2] highlighting the usefulness of ROTEM and of the calibrated automated thrombogram for studying the hypercoagulable state in BD patients.

In our study, we found an increase in the MCF by the INTEM test in a group of BD patients with various degrees of disease activity. Interestingly, INTEM-MCF significantly correlates with disease activity and with plasma levels of E-selectin, a marker of endothelial damage/activation.

We also observed a significant reduction in the CFT by the INTEM test in samples from BD. This last observation does not match with Bilge's report, and the difference might lie in

the fact that none of their patients were in the active phase of the disease during the study.

We recognize the high scientific value of the article by Bilge et al., and it strengthens our assumption that the ROTEM test may be a useful tool for monitoring the therapeutic response and disease progression in BD patients.

Disclosures None

References

1. Bilge NSY, Akay OM, Kaşifoğlu T et al (2013). The role of hemostatic mechanisms in the development of thrombosis in Behçet's disease: an analysis by modified rotation thromboelastogram (ROTEM). *Clin Rheumatol* Published. doi:10.1007/s10067-013-2368-2 Accessed 24 Aug 2013
2. Fernández-Bello I, López-Longo FJ, Arias-Salgado EG et al (2013) Behçet's disease: new insight into the relationship between procoagulant state, endothelial activation/damage and disease activity. *Orphanet J Rare Dis* 8:81

I. Fernández-Bello · E. G. Arias-Salgado · V. Jiménez-Yuste ·
N. V. Butta (✉)
Hematology Unit, Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ,
Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain
e-mail: nora.butta@salud.madrid.org

I. Fernández-Bello
e-mail: ihosvanyf@yahoo.es

E. G. Arias-Salgado
e-mail: elenagas@hotmail.com

V. Jiménez-Yuste
e-mail: vjimenez.hulp@salud.madrid.org

F. J. López-Longo
Rheumatology Unit, Hospital Universitario Gregorio Marañón,
Madrid, Spain
e-mail: fjlopezlongo@hotmail.com